

Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie

Generierung und Charakterisierung einer konditionalen Urocortin 2 überexprimierenden Mauslinie

Juliane Rhode

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst
2. Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 27.02.06 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01.07.07 angenommen.



Abb.1: „Melancholie“, Albrecht Dürer

1	Einleitung	1
1.1	Stress und Depression	1
1.2	Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRH).....	4
1.3	CRH-verwandte Neuropeptide	5
1.4	CRH Rezeptoren	7
1.5	Tiermodelle in der Depressionsforschung.....	10
1.6	Einblicke in die Bedeutung der CRH-Familie bei Stress und Angst mit Hilfe von Mausmodellen	12
1.7	Einfluss von UCN2 und UCN3 auf die Physiologie des Organismus	16
2	Zielsetzung	20
3	Material	21
3.1	Puffer und Lösungen	21
3.2	Chemikalien allgemein.....	23
3.3	Material für ES-Zellkultur.....	25
3.4	Geräte allgemein	27
3.5	Primer	28
3.6	Plasmide	28
3.7	Zelllinien	28
4	Methoden.....	30
4.1	Herstellung des Targeting Vektors.....	30
4.2	Methoden zur gezielten Manipulation eines Gens in ES-Zellen.....	35
4.3	Generierung chimärer Mäuse aus embryonalen Stammzellen.....	38
4.4	Genotypisierung mittels Southern Blot	40
4.5	Arbeiten mit Mausgewebe	42
4.6	Bestimmung von Stresshormonen im Blutplasma durch Radioimmunoassay.....	47
4.7	Glucocorticoidmetaboliten Bestimmung aus den Exkrementen der Maus	48
4.8	Tierhaltung und Hygienestatus.....	48
4.9	Metabolismusbestimmungen an Mäusen	49
4.10	Verhaltensexperimente.....	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Generierung einer UCN2 überexprimierenden Mauslinie	53
5.2	Überprüfung des Expressionsmusters	57
5.3	Expressionsanalyse CRH-relevanter Gene.....	57
5.4	Endokrinologische Analyse.....	63
5.5	Verhaltensstudien an UCN2 überexprimierenden Mäusen.....	65
5.6	Fressverhalten der UCN2 überexprimierenden Mäuse	74
5.7	Untersuchungen zum Metabolismus	80
5.8	Fettmessung.....	82
6	Diskussion	86
6.1	Generierung einer konditionalen UCN2 überexprimierenden Mauslinie	86
6.2	UCN2 Überexpression im ZNS.....	87
6.3	Expressionsanalyse CRH- relevanter Gene.....	87
6.4	Stresshormone im Blutplasma.....	90
6.5	Untersuchungen zum Verhalten von UCN2 überexprimierenden Mäusen.....	92
6.6	Fressverhalten der Mäuse.....	95
6.7	Untersuchungen zum Metabolismus	97
6.8	Corticosteron- Metaboliten aus dem Kot	98
6.9	Temperatur- und Fettmessung.....	99
7	Zusammenfassung	101
8	Literaturverzeichnis.....	103
9	Danksagung	113

Inhaltsverzeichnis

10	Lebenslauf	114
11	Erklärung	115

1 Einleitung

1.1 Stress und Depression

Die Krankheit Depression ist in den Industrieländern eine weit verbreitete, psychische Störung des Menschen. Fast jeder Fünfte leidet irgendwann in seinem Leben unter einer depressiven Periode. Bei gut der Hälfte dieser Personen wird die depressive Störung so schwer, daß eine Behandlung erforderlich wird. Depression ist ein globales Phänomen. Die *World Health Organization* (WHO) gibt an, dass über 121 Millionen Menschen weltweit davon betroffen sind und jährlich mehr als 800000 Neuerkrankungen hinzukommen. (Hilscher, 2006).

Als Schwermut oder Melancholie hat die Depression seit vielen Jahren Denker und Künstler bewegt. Die dunkle Schwere, die sich auf einen erkrankten Menschen legt findet z.B. Ausdruck in Dürers Werk „Melancholie“ (Abb. 1). Betroffene zeigen häufig eine freud- und hoffnungslose Verstimmtheit, unbegründete Ängste, Entschlusslosigkeit, eingeschränkte Libido, Schlafstörungen oder Appetitlosigkeit. Der Zustand ist für viele Schwereerkrankte (ca. 15%) so unerträglich, dass sie meist nur einen Ausweg sehen, den Suizid.

In der Geschichte der Psychotherapie findet man viele Ansätze zur Behandlung dieses Gemütszustandes. Angefangen mit Teufelsaustreibungen, über chirurgische Eingriffe bis hin zu Heilkrampftherapie durch Elektroschocks, Opiumbehandlungen oder Dauerschlaftherapie. In der modernen Psychotherapie kommen immer öfter und eine immer größer werdende Palette von Psychopharmaka zum Einsatz. Gängige Antidepressiva sind: TCA (Tricyclische Antidepressiva z.B. Amitriptylin), SSRI (Serotonin- Wiederaufnahmehemmer z.B. Citalopram), MAOH (Monoaminoxidasehemmer z.B. Moclobemid), sowie SNRI und NARI (Wiederaufnahmehemmer für Serotonin und/oder Noradrenalin z.B. Venlafexin oder Reboxetin). Eine weitere seit vielen Jahren verwendete Substanz ist Lithium. Sie wird meist nach einer Depression zur Prophylaxebehandlung verordnet (Berton and Nestler, 2006).

Die antidepressive Wirkung der oben aufgeführten Medikationen wurde eher empirisch und zufällig gefunden. Ein positiver Effekt für den Patienten ist erst nach mehreren Wochen erkennbar. Zudem treten unangenehme Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit, Verstopfung, Schwindel, Erhöhung des Augeninnendrucks oder Potenzprobleme auf. Daher ist die Wissenschaft stetig bestrebt, bessere und spezifischere Medikamente zu entwickeln.

Medikamente sind aber nicht das alleinige Hilfsmittel der Psychotherapie zur Behandlung von Depression. Das persönliche Gespräch mit dem Patienten ist unumgänglich. Zuspruch, Trost, Rat und vor allem Aufklärung über die Krankheit helfen zusätzlich diesen Gemütszustand zu überwinden.

Bei diesen Gesprächen kommt nicht selten zutage, dass der Depression eine stressintensive Lebensphase vorangegangen ist. Sei es der Verlust des Arbeitsplatzes oder eines geliebten Menschen, massiver Leistungsdruck oder eine Beziehungskrise. Viele Studien belegen, dass Stress Auslöser einer Depression sein kann und einen starken Einfluss auf den Verlauf der Krankheit hat (Kessler and Magee, 1994).

Langanhaltender Stress kann zu hormonellen Störungen führen. Hormone und andere körpereigene aktive Substanzen wie z.B. Adrenalin, Dopamin, Cortisol, Melatonin, Serotonin, Noradrenalin, Oxytozin usw. sind für die Homeostase des Körpers verantwortlich. Sie kommunizieren in einem komplizierten Netzwerk miteinander und regulieren sich gegenseitig. So koordinieren sie den Metabolismus z.B. durch Hunger- und Durstgefühle, den circadianen Rhythmus z.B. durch Müdigkeit oder Schlafintensität, sowie Sexualität und andere wichtige Funktionen des Organismus.

Stress ist primär aber nicht negativ für ein Individuum. Die evolutionsbiologische Funktion der Ausschüttung von Stresshormonen soll Aufmerksamkeit und Reaktionsfähigkeit steigern, um auf Gefahren schnell zu reagieren. Einem raschen Anstieg der Stresshormone folgt relativ kurz danach eine Rückkehr in die Homeostase. Diesen lebensnotwendigen Stress nennt man Eustress. Er steht im Gegensatz zu Distress, bei dem es eher zu einer blockierten Leistungsfähigkeit oder Überforderung kommt. In diesem Fall wird die stressinduzierte Hormonantwort übersteuert und der Hormonhaushalt gerät aus dem Gleichgewicht. Dies kann Nervosität, Schlafstörungen, Essstörungen, Kopfschmerzen und auch Depression zur Folge haben (Hegerl, 2004; Kielholz, 1973; Weitbrecht, 1973).

In vielen Studien mit psychiatrischen Patienten wurde eine enge Korrelation zwischen einer hyperaktiven Stresshormonantwort, der HPA-Achse (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis auch als HHN-Achse, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse bezeichnet) und Depression gefunden (Holsboer, 2000). Dieser Stressachse liegt folgende Funktion zugrunde: Bei Stress wird aus den hypothalamischen Nervenenden der parvizellulären Neuronen des *Nucleus paraventricularis* (PVN) vermehrt Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRH; Corticotropin releasing hormone) in den Hypophysenstiel der *Eminentia mediana* ausgeschüttet. Dort gelangt es über ein Pfortadersystem zur Adenohypophyse und stimuliert so die Sekretion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in den Blutkreislauf. Auf diesem

Weg gelangt ACTH zur Nebennierenrinde und regt dort die Synthese und Ausschüttung von Glucocorticoiden an, die es dem Körper ermöglichen, mit einer erhöhten Aktivierung des Organismus auf den Stressor zu reagieren. Die Glucocorticoide sind gleichzeitig aber auch für eine Abschwächung der CRH-Ausschüttung, d.h. für eine negative Rückkopplung der HPA-Achse und somit für eine Wiederherstellung des Gleichgewichts verantwortlich (Abb. 2).

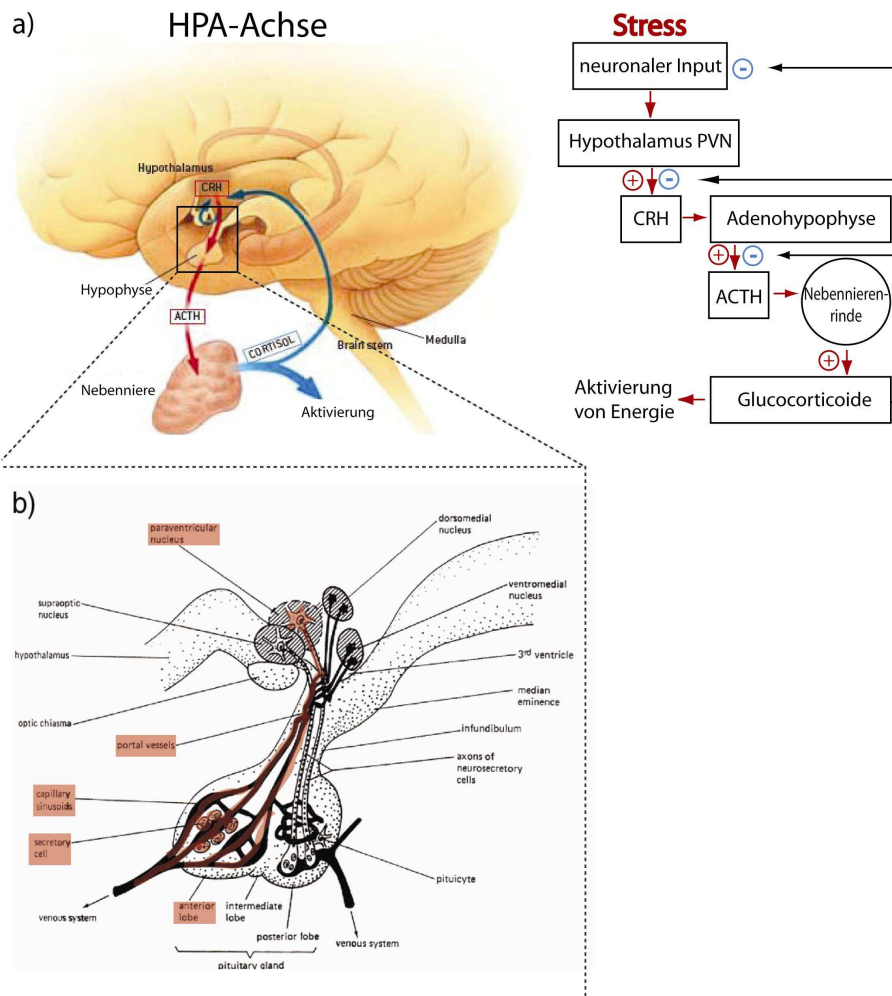


Abb.2 a) Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (HPA-Achse)

Stress erhöht die Expression von CRH im Hypothalamus und die Ausschüttung von CRH in der Eminentia mediana. CRH bindet an den CRH-Rezeptor Typ1 in der Adenohypophyse, dort kommt es zur Sekretion von ACTH. (Stress ausgelöste Vorgänge sind rot abgebildet.) ACTH gelangt über den Blutkreislauf zur Nebennierenrinde und regt dort die Produktion und Ausschüttung von Glucocorticoiden an. Glucocorticoide wirken metabotrop und ermöglichen es dem Körper, auf Stress zu reagieren. Sie sind auch Teil eines Rückkopplungssystems (blau) und vermindern die Ausschüttung von CRH und ACTH, in Anlehnung an (Seong et al., 2002)

b) Schematische Vergrößerung der Hypophyse und deren Verbindungen zum Hypothalamus

Vier Kernregionen im Hypothalamus, die an den PVN grenzen:

Nucleus dorsalis medialis, Nucleus ventralis medialis, Nucleus paraventricularis und Nucleus supraopticus. (Die für die HPA-Achse wichtigen Regionen sind rot unterlegt). Der parvizelluläre Anteil des Nucleus paraventricularis projiziert in die Zona externa der Eminentia mediana, dort kommt es zur Sekretion von hypothalamischen Neuropeptiden, z.B. CRH, die über ein Portalsystem zur Adenohypophyse (anteriore Hypophyse) transportiert werden. (aus Strand 1983)

Verschiedene Studien zeigen, dass Patienten mit Depressionen oder Angststörungen eine aus dem Gleichgewicht geratene HPA-Achse aufweisen. Man findet bei Patienten mit schwerer Depression einen erhöhten Cortisol- bzw. ACTH-Spiegel im Blutplasma und erhöhte CRH-Konzentrationen im Liquor (Holsboer et al., 1984b; Nemeroff et al., 1988; Nemeroff et al., 1984). Außerdem ist die Konzentration von freiem Cortisol im Urin erhöht (Carroll et al., 1976). Diese fehlgesteuerte HPA-Achse führt dazu, dass bei vielen depressiven Patienten auf eine intravenöse (i.v.) Dosis von CRH kein Anstieg von ACTH erfolgt, so wie das bei Gesunden der Fall ist (Holsboer 1984, Gold 1986). Eine Gabe von nur 1-2 mg Dexamethason hat aufgrund einer gestörten Rückkopplungsfunktion bei etwa 50% der Depressiven keine Suppression von ACTH und anderen Corticosteroiden zur Folge (Carroll, 1982). Einen weiteren Hinweis für die Involvierung der HPA-Achse bei schwerer Depression ergaben Expressionsstudien an Gehirngeweben von Suizidopfern, die erhöhte CRH-Transkription in hypothalamischen Kernen, vor allem im PVN, nachwiesen (Raadsheer et al., 1994; Raadsheer et al., 1995). Außerdem konnte man in Hirnpräparaten von Depressiven im präfrontalen Cortex eine verminderte CRH-Rezeptordichte feststellen (Owens and Nemeroff, 1991). Behandlungen mit Antidepressiva oder Elektrokrampf-Therapie konnten diese Veränderungen der HPA-Achse mildern oder gar normalisieren (Keck, 2005). Erste klinische Versuche an 20 depressiven Patienten mit einem CRH-Rezeptor Typ 1 (CRH-R1)-Antagonisten (R121919) zeigen vielversprechende Behandlungserfolge. Diese Substanz ist jedoch, wie viele andere Substanzen, die auf Neuropeptidrezeptoren wirken, lebertoxisch und kann daher nicht als neues Antidepressivum eingesetzt werden (Bosker et al., 2004; Zobel et al., 2000).

Diese Befunde deuten also darauf hin, dass Stresshormone, im besonderen CRH, ACTH und Cortisol, mit Depression in enger Verbindung stehen und in diesem Bereich ein neuer Therapieansatz gefunden werden kann.

1.2 Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRH)

Das CRH wurde 1981 erstmals von Vale und Kollegen isoliert und beschrieben (Vale et al., 1981). Inzwischen ist bekannt, dass es von zwei Exons kodiert wird und durch proteolytische Prozessierung aus einem aus 196 Aminosäure bestehenden Prä-Pro-Peptid hervorgeht. Das biologisch aktive CRH besteht aus 41 Aminosäuren (4,7 kDa) und ist in vielen Spezies wie Maus, Ratte, Mensch und Schaf phylogenetisch hoch konserviert (Seasholtz et al., 1988).

Immunhistochemische und *In situ*-Expressionsanalysen an Ratten und Mäusen zeigen, dass das CRH sowohl in vielen Kernen des Gehirns als auch im peripheren Gewebe zu finden ist (Cummings et al., 1983; Imaki et al., 1991; Mezey and Palkovits, 1991). Eine starke Expression des CRHs findet man im Neocortex, der zentralen Amygdala, im *Bed nucleus of stria terminalis* (BNST), dem Septum, der Pons, im *Locus coeruleus*, dem *Nucleus (Ncl.) raphe* und vor allem in den parvizellulären Neuronen des PVN. Diese Gehirnregionen sind mitunter, wie oben beschrieben, an der Stresshormonkaskade beteiligt. In peripheren Geweben konnte CRH in der Plazenta, in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt, in der Bauchspeicheldrüse, im Herzen, in Milz, Nebenniere und Leber, außerdem in den Hoden, in den Ovarien, im Thymus und in der Haut nachgewiesen werden. CRH spielt in diesen Organen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homeostase des Organismus. Es nimmt Einfluss auf den Metabolismus, auf den circadianen Rhythmus, auf das Immunsystem und auch auf das Verhalten des Individuums (Holsboer, 1999; Koob and Heinrichs, 1999; Koob et al., 1993; Owens and Nemeroff, 1991; Pich et al., 1993; Salas et al., 1997). Fehlregulierungen des Peptids und somit auch der HPA-Achse sind vielleicht ursächlich für eine Vielzahl von psychiatrischen Erkrankungen, darunter Depression, Angsterkrankungen oder Anorexia (Berridge and Dunn, 1989; Nemeroff et al., 1984).

1.3 CRH-verwandte Neuropeptide

Im Laufe der letzten 20 Jahre wurden weitere CRH-verwandte Peptide identifiziert. Urotensin I und Sauvagine wurden in Amphibien und Fischen nachgewiesen und haben eine ähnliche Aufgabe wie CRH in Säugetieren (Lovejoy and Balment, 1999).

Urocortin (UCN) wurde 1995 von Vaughan und Kollegen als ein zu CRH 45% homologes Peptid gefunden (Vaughan et al., 1995). Das Expressionsmuster im Nagerhirn unterscheidet sich jedoch drastisch von dem des CRHs. UCN ist am stärksten im *Ncl. Edinger-Westphal*, aber auch in einzelnen Neuronen im *Ncl. olivaris lateralis superior*, dem Hippocampus, den Basalganglien, im Hypophysenvorderlappen, im *Ncl. supraopticus* (SON) und in Kernen des Stammhirns exprimiert (Oki et al., 1998; Turnbull et al., 1999; Wong et al., 1996).

Eine Stimulation durch UCN hat nur geringe Auswirkungen auf die Ausschüttung von ACTH (Turnbull and Rivier, 1997). Dafür hat es einen deutlich reduzierenden Effekt auf die Futter- und Wasseraufnahme (Jones et al., 1998; Spina et al., 1996) sowie auf angstähnliches Verhalten (Vaughan et al., 1995).

Erst 2001 wurden zwei weitere CRH-verwandte Peptide *in silico* über Sequenzhomologieanalysen entdeckt. Urocortin 2 (UCN2) auch als *Stresscopin-Related Peptide* (SRP) bekannt und Urocortin 3 (UCN3) auch *Stresscopin* (SCP) genannt (Hsu and Hsueh, 2001; Reyes et al., 2001). Reifes, biologisch aktives UCN2 ist mit CRH zu 47% in seiner Aminosäuresequenz identisch. Humanes und Maus UCN2 weisen eine Homologie von 76% auf. UCN3 hingegen hat eine noch geringere Homologie zu CRH (32%) als UCN2, wobei die Aminosäuresequenzen zwischen den Spezies Maus und Mensch nahezu identisch sind (90%) (Abb. 4).

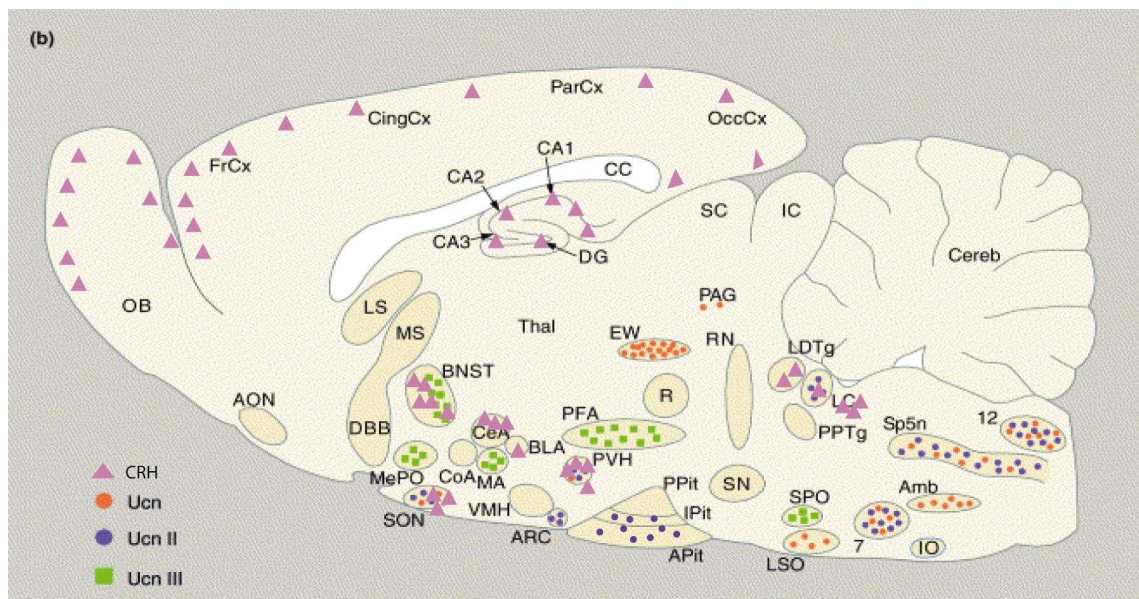


Abb. 3: **Expression von CRH und CRH-verwandten Neuropeptiden im Nagerhirn** (aus(Reul and Holsboer, 2002) modifiziert)

Abkürzungen: 7: facial nucleus; 12: hypoglossal nucleus; Amb: ambiguus nucleus; AON: anterior olfactory nucleus; AP: area postrema; Apit: anterior pituitary; ARC: arcuate nucleus; BasalG: basal ganglia; BLA: basolateral amygdala; CA1-3 of Ammon's horn; CC: corpus callosum; CeA: central nucleus of the amygdala; Cereb: cerebellum; CingCx: cingulate cortex; CoA: cortical nucleus of the amygdala; DBB: diagonal band of Broca; Deep N: deep nuclei; DG: dentate gyrus; FrCx: frontal cortex; IC: inferior colliculi; IO: inferior olive; IPit: intermediate pituitary; LC: locus coeruleus; LDTg: laterodorsal tegmental nucleus; LSO: lateral superior olive; MA: medial nucleus of amygdala; MePO: median preoptic area; MS: medial septum; NTS: nucleus tractus solitarii; OB: olfactory bulb; OccCx: occipital cortex; PAG: periaqueductal gray; ParCx: parietal cortex; PFA: perifornical area; PG: pontine gray; PPit: posterior pituitary; PPTg: pedunculopontine tegmental nucleus; R: red nucleus; R: raphe nuclei; SC: superior colliculi; SPO: superior paraolivary nucleus; Thal: thalamus.

Expressionsstudien an Rattenhirnen zeigen, dass UCN2 in Stressachsen-relevanten Regionen im Gehirn im speziellen im Hypothalamus, im PVN, im SON und *Ncl. arcuatus* exprimiert wird. Zusätzlich findet man UCN2 in der anterioren und intermediären Hypophyse, sowie im Cortex und der Medulla der Nebenniere. Außerdem konnte UCN2 Expression im Magen, in der Haut, in den Ovarien, im Uterus und im Skelettmuskel festgestellt werden (Chen et al., 2004; Reyes et al., 2001; Yamauchi et al., 2005).

UCN3 wurde im Hypothalamus im PVN und im *Ncl. preopticus*, in der medianen Amygdala, im BNST, im *Ncl. paraolivariis superior*, in der *perifornical area*, in der *median preoptic area* und im lateralen Septum nachgewiesen. In peripheren Geweben befinden sich UCN3 exprimierende Zellen im Darm und in der Haut. (Hsu and Hsueh, 2001; Lewis et al., 2001) (siehe Abb. 3)

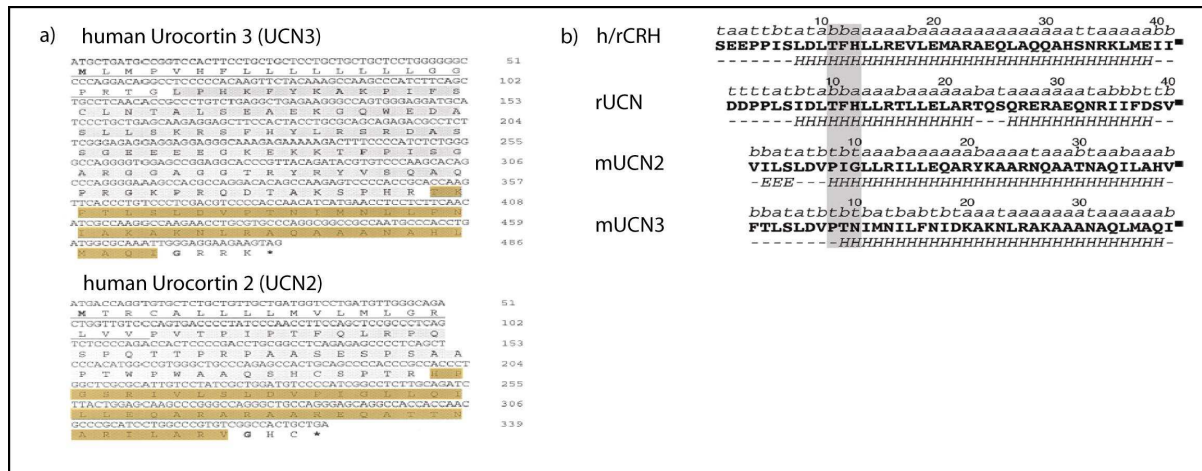


Abb. 4: a) cDNA und Aminosäuresequenzen des offenen Leserahmens (ORF) von UCN3 (SCP) und UCN2 (SRP). Die Aminosäuresequenz (AS) für das wahrscheinliche Signalpeptid ist unterstrichen. Das voraussichtliche Stopp-Codon ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die AS des reifen Peptids ist gelb unterlegt, die Region des Prä-Pro-Proteins grau. (Hsu and Hsueh, 2001)

b) Vergleich der Aminosäuresequenzen von h/rCRH, rUCN, mUCN2 und mUCN3.

Über jedem Aminosäurerest steht die bevorzugte Konformation : a ; α -helix, b; β -strand, t; reverse turn. Unter jeder Aminosäure steht die vorhergesagte Sekundärstruktur: H; Helix, E; extended (loop) und ---; other loop. ■; repräsentiert die C-terminale Aminogruppe. (Jahn et al., 2004).

1.4 CRH Rezeptoren

CRH und CRH-verbundene Peptide sind natürliche Liganden der CRH-Rezeptoren. Bislang sind zwei Typen dieser G-Protein-gekoppelten-sieben-Transmembran-Rezeptoren bei Säugetieren bekannt: CRH-R1 und CRH-R2 (Chen et al., 1993; Kishimoto et al., 1995; Lovenberg et al., 1995a; Lovenberg et al., 1995b; Perrin et al., 1995; Perrin et al., 1993). Beide Rezeptoren kommen in mehreren Isoformen in verschiedenen Spezies und Geweben vor. Sie sind zu 70% in ihrer Aminosäuresequenz homolog und unterscheiden sich hauptsächlich im N-Terminus.

Zusätzlich zu der aktiven CRH-R1-Isoform CRH-R1 α , die man im Menschen und in der Maus findet, gibt es noch CRH-R1 β und mehrere Untergruppen c-h, deren Funktion aber noch unbekannt ist (Chen et al., 1993; Grammatopoulos and Chrousos, 2002; Grammatopoulos et al., 1999; Pisarchik and Slominski, 2001; Ross et al., 1994).

Für den CRH-R2 sind inzwischen im Menschen drei aktive Splicevarianten identifiziert worden CRH-R2 α , CRH-R2 β und CRH-R2 γ , in der Ratte jedoch nur zwei (α , β) (Lovenberg et al., 1995a; Perrin et al., 1995). Daraus ergibt sich, dass sich CRH-R2 γ phylogenetisch vermutlich erst spät zu einer aktiven Variante etabliert hat.

Die CRH-R1 α mRNA ist nahezu ubiquitär im Säugerhirn detektierbar. Besonders starke Expression ist im *Bulbus olfactorius*, im Neocortex, im Kleinhirn, im Hippocampus, in der Amygdala und der Adenohypophyse zu finden. In der Peripherie ist der Rezeptor u.a. in den Hoden, den Ovarien, der Haut und der Nebenniere exprimiert.

Die CRH-R2 α mRNA ist die dominante Isoform, die im Gehirn von Maus und Mensch in spezifischen Regionen exprimiert wird. Die größte Dichte an CRH-R2 α produzierenden Neuronen liegt im lateralen Septum, dem BNST, dem ventromedialen Kern des Hypothalamus, dem *Bulbus olfactorius* und dem *Ncl. raphe*. CRH-R2 β hingegen findet man eher in peripheren Geweben wie im Skelettmuskel, in der Haut, in der Lunge, in den Nieren, im Darm und im Herzen, aber auch im *Plexus choroideus* im Gehirn (Van Pett et al., 2000) (Abb.5).

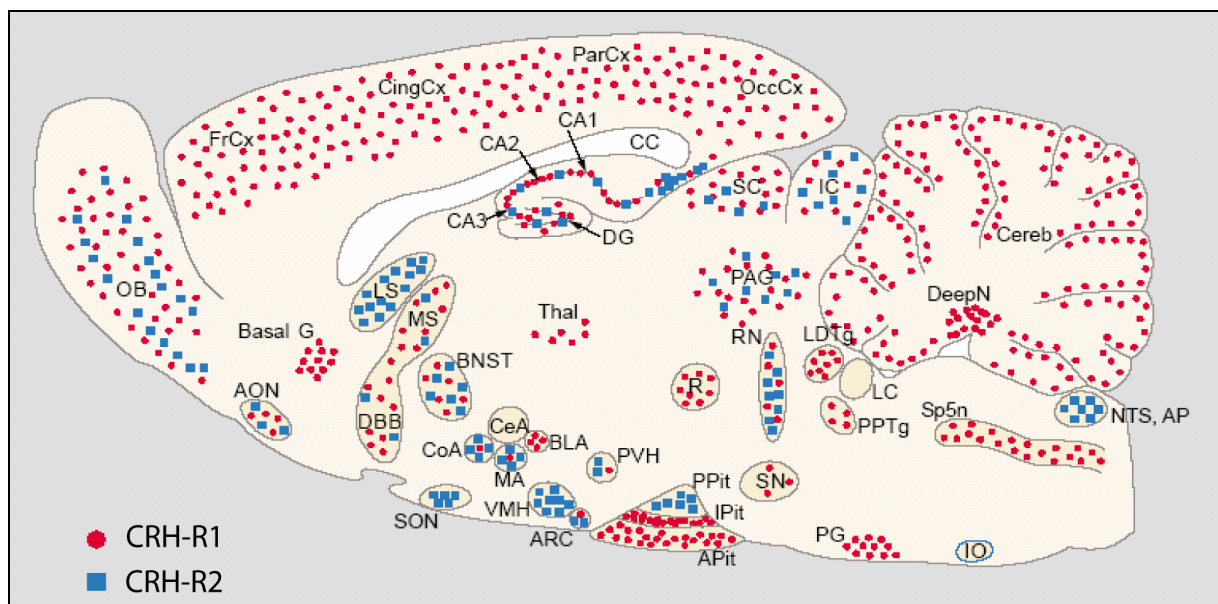


Abb. 5: Expressionsmuster von CRH-R1 und CRH-R2 mRNA im Sagittalschnitt des Nagerhirns. Die mRNA Verteilung basiert auf in situ Hybridisierungsstudien bei Maus und Ratte (Bittencourt and Sawchenko, 2000; Chalmers et al., 1995; Van Pett et al., 2000). Der dargestellte sagittale Schnitt ist neuroanatomisch nicht exakt. Abkürzungen sind in Abb. 4 erläutert (Reul and Holsboer, 2002).

Der Vollständigkeit halber sollte eine erst kürzlich entdeckte dritte Variante des CRH-Rezeptors erwähnt werden, der bisher nur im Katzenhai nachgewiesene CRH-R3 (Arai et al., 2001). Dieser Rezeptor ist in seiner Aminosäure-Struktur mit CRH-R1 zu 85% und mit

CRH-R2 zu 80% identisch. Er wird ebenso wie CRH-R1 in verschiedenen Regionen des Gehirns und in der Hypophyse des Katzenhais exprimiert.

Zusätzlich zu ihren strukturellen Unterschieden besitzen die Rezeptoren auch verschiedene pharmakologische Eigenschaften. Der CRH-R1 zeigt eine starke Bindungsaffinität zu den Liganden CRH und UCN, jedoch eine vernachlässigbare Affinität zu UCN2 und UCN3 (Vaughan et al., 1995). Im Gegensatz dazu können UCN, UCN2 und UCN3 energetisch weitaus günstiger an CRH-R2 binden als CRH selber (Abb.6) (Lewis et al., 2001; Reyes et al., 2001). Der CRH-R3 bindet CRH mit einer 5-fach höheren Affinität als Urotensin und Sauvagine.

Ein weiteres CRH bindendes Molekül ist das *CRH-binding* Protein (CRH-BP). CRH-BP ist ein 37 kDa großes Protein, das sowohl in der Maus als auch im Menschen zu finden ist. Die Bindungsaffinität von CRH zu CRH-BP ist ähnlich hoch wie die zu dem eigentlichen Rezeptor CRH-R1. CRH-BP scheint die Aktivierung des CRH-R1 durch CRH in der Plazenta und in der Hypophyse zu puffern und somit die endokrine Aktivität von CRH zu modulieren (Potter et al., 1991; Potter et al., 1992; Potter et al., 1994).

Die differentielle Expression von CRH-R1 und CRH-R2 und deren selektive Affinitäten zu den endogenen Liganden deuten auf unterschiedliche physiologische Funktionen der sehr eng verwandten Rezeptoren hin. Im Tiermodell konnte man diese verschiedenen Aufgaben der Rezeptoren verdeutlichen.

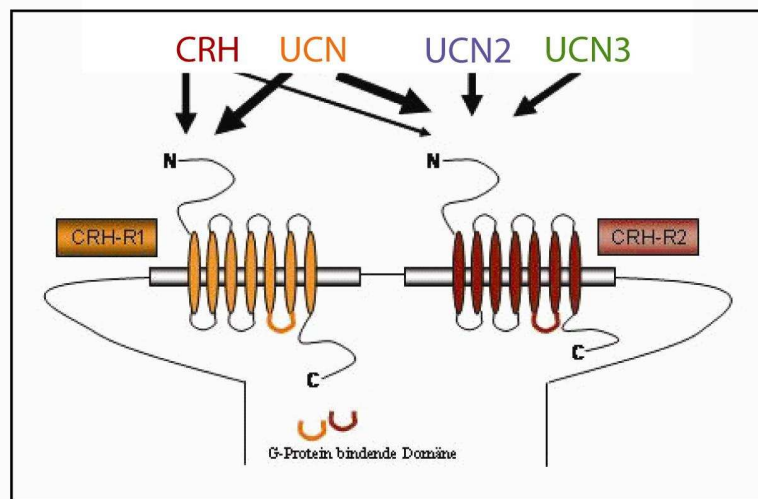


Abb.6: Die Familie der CRH-Peptide und ihre Rezeptoren.

Die Pfeile repräsentieren die Liganden-Rezeptor-Interaktionen. Die Stärke der Pfeile reflektiert die relativen Bindungsaffinitäten.

1.5 Tiermodelle in der Depressionsforschung

Die Maus als Tiermodell für psychiatrische Erkrankungen, vor allem für Depression, zu verwenden, ist ein umstrittenes Thema. Man konnte sich aber darauf einigen, dass Mausmodelle a) ähnliche Symptome wie erkrankte Menschen aufweisen müssen, b) auf Medikamente in ähnlicher Weise reagieren sollten wie Menschen (d.h. wirksame Substanzen wirken auch bei der Maus und unwirksame Substanzen haben keinen Effekt auf die Symptomatik der Maus), c) durch ähnliche Ursachen Krankheitssymptome entwickeln und d) Veränderungen in ähnlichen biochemischen und neurochemischen Prozessen zeigen (Abdelrahman et al., 2005).

Die Symptome einer schweren Depression sind im „Diagnostic statistical manual“ (DSM-IV) der *American Psychiatric Association* 1994 zusammengefasst worden. Hauptsymptome sind Lustlosigkeit, Anhedonismus, Antriebslosigkeit und Erschöpfung. Weitere Anzeichen der Krankheit sind verringerte kognitive Fähigkeiten, psychomotorische Störungen (agitierend oder retardierend), Schuldgefühle, Wertlosigkeitsgefühl, Hoffnungslosigkeit bis hin zu suizidalen Gedanken. Zu diesen eher psychischen Auffälligkeiten kommen noch vegetative Beeinträchtigungen wie Schlafstörungen, Gewichtsveränderung durch Appetitlosigkeit oder Fresssucht und Libidoverlust hinzu. Es treten jedoch nicht alle Symptome bei jedem Patienten auf und das Auftreten der einzelnen Symptome bedeutet auch nicht automatisch die Erkrankung an einer schweren Depression. Dies sind nur Hinweise auf die Krankheit, die sich aus dem Gesamtbild der verschiedenen Symptome ergibt. Im Mausmodell können manche dieser Krankheitserscheinungen untersucht werden. So lassen sich zwar Schuldgefühle, Wertlosigkeitsgefühl und Suizidgedanken nicht in der Maus nachweisen, aber über gezielte Versuche kann man Anhedonismus, „Auswegslosigkeit“, gesteigertes ängstliches Verhalten, verändertes psychomotorisches Verhalten, Gewichtsverlust bzw. -zunahme, Schlafstörungen, verändertes Sexualverhalten und vor allem hormonelle Veränderungen untersuchen (Tabelle 1).

Seit den 80iger Jahren ist es möglich, das Genom der Maus mit molekularbiologischen Methoden zu verändern. So können zum Beispiel zusätzlich Gene in das Mausgenom eingeschleust werden. Die Expression dieser Gene kann durch einen zusätzlich integrierten Promotor kontrolliert werden. Bei diesen klassisch *transgenen* Mäusen integriert das Genkonstrukt in einfacher oder mehrfacher Kopie an einer zufälligen Stelle im Genom und führt so zu einem *gain-of-function*.

Um Gene im Organismus der Maus gezielt zusätzlich zu exprimieren (*gain-of-function*) oder auszuschalten (*loss-of-function*), müssen *knock in* bzw. *knock out* Mäuse über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert werden. Dieses Verfahren ist inzwischen so weit etabliert, dass es eine Vielzahl verschiedener *knock in* bzw. *knock out* Mauslinien gibt. Diese erlauben es zum Beispiel in die komplizierten Regelmechanismen der Stresshormonkaskade einzugreifen. Mit Hilfe solcher Mäuse konnten neue Erkenntnisse über die HPA-Achse, das CRH-System und deren Einfluss auf den Organismus und die im Zusammenhang stehenden psychiatrischen Erkrankungen gewonnen werden.

DSM IV	DSM für Mäuse (mDSM I)
<p>Hauptsymptome</p> <ul style="list-style-type: none"> · Depressive Stimmung („Traurigkeit“) · Anhedonismus · Antriebslosigkeit und Ermüdung 	<p>Hauptsymptome</p> <ul style="list-style-type: none"> · „Anhedonismus“ (Konsum einer Zuckerlösung, intracraniale Selbststimulation) · „Auswegslosigkeit“ (<i>Learned Helplessness</i>) · „Hoffnungslosigkeit“ (<i>Porsolt Forced Swim Test</i>)
<p>Assoziierte psychopathologische Symptome</p> <ul style="list-style-type: none"> · Hoffnungslosigkeit, Schuldgefühle · kognitive Störungen · Suizidgedanken · Überempfindlichkeit · Psychomotorische Störungen 	<p>Assoziierte Verhaltensänderungen</p> <ul style="list-style-type: none"> · Angst & Neophobia (<i>O-Maze, EPM, Dark/light box</i>) · Psychomotorisches Verhalten (<i>Activity chambers, Open field Test</i>)
<p>Vegetative Symptome</p> <ul style="list-style-type: none"> · Schlafstörungen · Essstörungen · Libidoverlust · Veränderungen des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Systems (HPA) 	<p>Vegetative und biologische Anzeichen</p> <ul style="list-style-type: none"> · Verändertes Schlaf-, Ess- und Sexualverhalten · Veränderungen des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Systems (HPA)

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Symptomen depressiver Menschen laut *Diagnostic statistical Manual IV* und depressionsähnlichem Verhalten bei Mäusen. Angelehnt an (Deussing, 2006; Gass et al., 2001)

1.6 Einblicke in die Bedeutung der CRH-Familie bei Stress und Angst mit Hilfe von Mausmodellen

Das Neuropeptid CRH spielt, wie schon oben beschrieben, eine große Rolle in der Bewältigung von Stress und Angst, beides potentielle Auslöser psychischer Störungen.

Transgene Mäuse, die CRH exogen unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven Metallothionin-Promotors exprimieren, zeigen eine chronisch fehlregulierte HPA-Achse und ein verstärkt ängstliches Verhalten. Endokrinologische Untersuchungen dieser Mäuse haben gezeigt, dass sie einen dreifach höheren ACTH- und einen zehnfach höheren Corticosteron-Spiegel im Vergleich zu nicht transgenen Tieren aufweisen. Dieser extrem erhöhte Corticosteron-Spiegel führt dazu, dass sie an Hautatrophie, Alopezie, Osteoporose und Stammfettsucht leiden, alles Symptome des so genannten *Cushing-Syndroms*, wie es auch beim Menschen beschrieben wird. Durch die basal erhöhten ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen bleibt eine Aktivierung der HPA-Achse durch Stress aus. Diese deutliche Erhöhung der Stresshormone führt zu einer Schwächung des Immunsystems, was sich in einer Reduktion der Lymphozyten niederschlägt. CRH transgene Mäuse zeigen ein erhöhtes angstähnliches Verhalten auf der *elevated plus maze* (EPM), das bei zusätzlicher Gabe eines CRH-Rezeptor Antagonisten (α -helicales CRH) wieder abgeschwächt werden kann. Die Entnahme der Nebenniere bei diesen transgenen Tieren führt zu einer Normalisierung der Corticosteron-Werte. Dieser Eingriff beeinflusst jedoch das gesteigerte angstähnliche Verhalten der CRH transgenen Mäuse nicht (Stenzel-Poore et al., 1996). Zudem weisen Wildtypmäuse, denen man intracerebroventrikulär (i.c.v.) CRH verabreichte, eine verminderte Futteraufnahme, geringere sexuelle Aktivität und Schlafrythmusstörungen auf (Heinrichs et al., 1991; Sirinathsinghji et al., 1983), Symptome, die an die Auswirkungen einer Depression erinnern.

Eine weitere CRH überexprimierende Mauslinie wurde 2002 von Groenink et al. generiert. In dieser transgenen Maus wird die CRH-Expression durch den Thy-1 Promotor kontrolliert. Da dieser Promotor nur postnatal in Neuronen aktiv ist, wird CRH hier nur im ZNS und nicht im gesamten Organismus verstärkt exprimiert. Ähnlich wie in der zuerst veröffentlichten Mauslinie haben diese Mäuse unter basalen Bedingungen einen erhöhten Corticosteron-Spiegel. Jedoch reagieren sie auf Stress mit einem normalen Anstieg der Stresshormone (Groenink et al., 2002). Diese Mauslinie zeigt außerdem signifikante Veränderungen in der Körpertemperatur, der Herzfrequenz sowie in der Wasser- und Futteraufnahme (Dirks et al., 2002).

All diese Indizien verdeutlichen, dass eine Überproduktion von CRH zu depressionsähnlichen Symptomen bei der Maus führen kann. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass wahrscheinlich

nicht die aus dem Gleichgewicht gebrachte HPA-Achse Auslöser des veränderten Angstverhaltens ist, sondern die Hyperaktivität des zentralen CRH-Systems.

Im Gegensatz dazu zeigen *CRH-knock out* Mäuse keinen offensichtlichen Verhaltensphänotypen. Die CRH-defizienten Mäuse verhalten sich in den durchgeführten Verhaltenstests genau so wie Wildtypiere (Muglia et al., 1995; Swiergiel and Dunn, 1999; Weninger et al., 1999b), obwohl bei endokrinologischen Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen *knock out* und Wildtypmäusen festgestellt wurden. Durch das Fehlen von CRH kann die HPA-Achse nicht mehr vollständig aktiviert werden. Bei Stress kommt es daher nur zu einem mäßigen Anstieg von ACTH und Corticosteron (Jacobson et al., 2000; Muglia et al., 1995). Eine Restaktivität der HPA-Achse ist also noch vorhanden. Es ist wahrscheinlich, dass kompensatorische Mechanismen für die Aufrechterhaltung einer reduzierten HPA-Achsen-Aktivität verantwortlich sind. Muglia und seine Kollegen konnten in weiteren Experimenten feststellen, dass Arginin Vasopressin (AVP) im PVN erhöht exprimiert wird. AVP hat ebenso wie CRH die Fähigkeit, die ACTH Ausschüttung in der Hypophyse zu stimulieren. Außerdem fanden sie heraus, dass UCN im *Ncl. Edinger Westphal* vermehrt vorhanden ist (Weninger et al., 1999a; Weninger et al., 1999b; Weninger et al., 2000). Da UCN sowohl an den CRH-R1 als auch an den CRH-R2 binden kann, könnte es teilweise Funktionen des CRH übernommen haben, um den Verlust auszugleichen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CRH ein wichtiger Faktor, aber wohl bei weitem nicht der einzige Faktor in der Stressantwort und bei Angstverhalten ist. Weitere Mitglieder der CRH-Familie müssen näher untersucht werden, um deren Funktion besser zu verstehen.

Daher wurden zwei *UCN-knock out* Mauslinien unabhängig voneinander generiert. Die Funktion der Stressachse dieser Mäuse ist durch den Verlust des UCNs nicht beeinträchtigt. Die *knock out* Tiere weisen einen normalen basalen ACTH- und Corticosteron- Spiegel im Blut auf (Vetter et al., 2002; Wang and Kotz, 2002). Auch nach Stress konnte die Arbeitsgruppe von Vetter keine Abweichungen zur normalen HPA-Achsen Reaktion feststellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass UCN die Aktivität der HPA-Achse nicht beeinflusst. Das angstähnliche Verhalten wurde durch den Verlust von UCN in einer der beiden Mauslinien jedoch verstärkt (Vetter et al., 2002). Der *UCN-knock out* führt außerdem zu einer Reduktion der CRH-R2 Expression im lateralen Septum, welches Afferenzen vom *Ncl. Edinger Westphal* enthält. Diese Afferenzen sind in Wildtypmäusen UCN-immunreaktive Fasern (Bittencourt et al., 1999). Eine chronische Behandlung von Mäusen mit Benzodiazepin, einem Anxiolytikum, führt dazu, dass die UCN Expression im *Ncl. Edinger Westphal* und die CRH-R2 Expression im lateralen Septum erhöht wird. Das deutet

möglicherweise darauf hin, dass die Aktivierung des CRH-R2 durch UCN im lateralen Septum das Angstverhalten unabhängig von der HPA-Achse moduliert.

UCN i.c.v. in Rattenhirn appliziert führt zu einem konträren Ergebnis. Die Ratten zeigen ein gesteigertes ängstliches Verhalten (Moreau et al., 1997; Slawecki et al., 1999). Dies scheint aber nicht ein Effekt über die Aktivierung des CRH-R2 im lateralen Septum zu sein, sondern vielmehr vermittelt durch den CRH-R1, der auch durch UCN aktiviert werden kann. Durch diese Experimente wird klar, dass die Aktivierung oder Deaktivierung des CRH-R1 und des CRH-R2 an der Ausprägung von ängstlichem Verhalten beteiligt ist.

Zwei weitere Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander eine CRH-R1 defiziente Mausmutante generiert (Smith et al., 1998; Timpl et al., 1998). In Verhaltenstests zeigen die CRH-R1 defizienten Mäuse ein reduziertes angstähnliches Verhalten und bestätigen somit indirekt die Ergebnisse aus der CRH-Überexpressionsstudie sowie den CRH und UCN i.c.v. Applikationsstudien, in denen vermehrtes CRH oder UCN zu erhöhtem Angstverhalten führt. In beiden Mauslinien wird die zentrale Rolle des CRH-R1 im Rahmen der hormonellen Antwort auf Stress deutlich. Stress kann nur einen minimalen Anstieg im ACTH- und Corticosteron-Spiegel hervorrufen. Erstaunlicherweise ist die basale ACTH-Konzentration im Vergleich zu Wildtyptieren unverändert. Dieser Effekt lässt sich höchstwahrscheinlich auf die kompensatorische Wirkung des AVP und des AVP V1a Rezeptors zurückführen (Muller et al., 2000). Das reduzierte Angstverhalten scheint aber auch hier von der veränderten HPA-Achse unabhängig zu sein. Dies belegen Studien an einer konditionalen CRH-R1-*knock out* Maus, bei der der CRH-R1 im Vorderhirn und in weiten Teilen des Limbischen Systems ausgeschaltet, in den HPA-Achsen relevanten Regionen, wie der Hypophyse, jedoch intakt gelassen wurde. In diesen konditionalen CRH-R1-*knock out* Mäusen sind die basalen ACTH- und Corticosteron-Werte im normalen Bereich. Die Mäuse verhalten sich aber in Verhaltenstests (*Dark/Light Box*; EPM) weniger ängstlich als Kontrolltiere (Muller et al., 2003). Die Aktivierung des CRH-R1 im Limbischen System ist also maßgeblich an ängstlichem Verhalten beteiligt. In dieser Studie wurde außerdem festgestellt, dass der CRH-R1 im Vorderhirn eine wichtige Rolle bei der Rückkopplung der HPA-Achse spielt. Die konditionalen CRH-R1-*knock out* Mäuse zeigen nach Immobilisationsstress eine länger anhaltende Erhöhung der Stresshormone, ACTH und Corticosteron, im Blutplasma als Wildtypmäuse. Veränderungen in dieser Rückkopplungsfunktion wurden auch bei depressiven Patienten durch den Dexamethason/ CRH-Stimulationstest nachgewiesen (Holsboer, 2000; Holsboer et al., 1984a; Modell et al., 1997).

Den Auswirkungen der Deletion des CRH-R2 sind drei unabhängige Arbeitsgruppen nachgegangen (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). An den unterschiedlichen Ergebnissen dieser Gruppen kann man sehen, wie sensibel der Hormonhaushalt auf minimale Veränderungen der Untersuchungsmethoden sowie den genetischen Hintergrund der Mäuse reagiert. Jedoch lassen sich auch aus diesen drei unterschiedlichen Mauslinien Erkenntnisse über die Rolle des CRH-R2 gewinnen. In zwei der drei Studien zeigten die CRH-R2-*knock out* Mäuse eine veränderte Reaktivität der HPA-Achse (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000). ACTH steigt schneller an und bleibt länger erhöht. Dies deutet darauf hin, dass CRH-R2 für die Feinabstimmung und Dämpfung der Stressantwort verantwortlich sein könnte und dies wahrscheinlich unabhängig von der Hypophysenaktivität. Verschiedene Verhaltenstests wie EPM, *Dark/Light Box* und *Open field* Test (OF) weisen zumindest in zwei Mauslinien darauf hin, dass sich CRH-R2-*knock out* Tiere ängstlicher verhalten als Wildtypiere (Bale et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). Somit führt der Verlust des Liganden UCN oder des Rezeptors CRH-R2 in Mäusen (zumindest in den meisten Studien) zu einem gesteigerten ängstlichen Verhalten. Der Verlust des CRH-R1 hingegen hat eher Angst mindernde Effekte. Nun stellt sich die Frage, wie sich dann Mäuse, bei denen beide Rezeptoren deletiert werden, verhalten. Dieser Aufgabe haben sich zwei Arbeitsgruppen gewidmet und zwei CRH-R1/R2 Doppel-*knock out* Mauslinien generiert (Bale et al., 2002; Preil et al., 2001). In beiden CRH-R1/2 Doppel-*knock out* Mauslinien kommt es zu einer verminderten Erhöhung der Stresshormone ACTH und Corticosteron nach Stress. Preil und seine Kollegen konnten außerdem zeigen, dass die Stressantwort bei Verlust beider Rezeptoren noch abgeschwächt ist als bei CRH-R1-*knock out* Mäusen. Dieses Ergebnis bestätigt wiederum die schon oben genannte Vermutung, dass der CRH-R2 außerhalb der Hypophyse in die Stressantwort eingreift und die ACTH- Ausschüttung modulieren kann. Die Untersuchung des Angstverhaltens dieser Mäuse führt zu keiner eindeutigen Antwort. Es scheint einen geschlechtsspezifischen Unterschied innerhalb der CRH-R1/2 Doppel-*knock out* Mauslinie zu geben. Weibchen zeigen eine Angstreduktion, während Männchen eher ein gesteigertes angsthäufiges Verhalten aufweisen. Die Sexualhormone und der genetische Hintergrund des Muttertiers haben einen starken Einfluss auf die Ausprägung des Angstverhaltens. Daher lassen sich die Verhaltensstudien mit diesen CRH-R1/2 Doppel-*knock out* Tieren nur schwer interpretieren.

Die endokrinologischen Untersuchungen an den verschiedenen Mausmodellen zeigen, dass der CRH-R2 eine nicht zu unterschätzende Rolle in der HPA-Achsen Aktivierung, in den Rückkopplungsmechanismen und der Homeostase des Organismus spielt. Untersuchungen

des CRH-R2-Liganden UCN zeigen, dass UCN keine entscheidende Funktion in der HPA-Achsen-Aktivität hat. Somit gewinnen die erst kürzlich gefundenen endogenen Liganden des CRH-R2, UCN2 und UCN3 immer mehr an Interesse.

1.7 Einfluss von UCN2 und UCN3 auf die Physiologie des Organismus

Die erst kürzlich entdeckten Liganden des CRH-R2, UCN2 und UCN3 bieten neue Ansatzpunkte zur Aufklärung der Funktionalität der CRH-Rezeptoren. Daher wurden ihre Wirkungsmechanismen eingehend untersucht.

Wie oben schon erwähnt, wurde in detaillierten Affinitäts- und Aktivierungsstudien mehrfach gezeigt, dass UCN3 nur an den CRH-R2 bindet und auch nur diesen aktivieren kann (Hsu and Hsueh, 2001; Jahn et al., 2004; Lewis et al., 2001). Auch UCN2 besitzt eine hohe Affinität und Aktivierungseffizienz für die CRH-R2 Splicevarianten α und β . Eine zusätzliche Stimulation des CRH-R1 durch UCN2 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es wurde nämlich gezeigt, dass in mit CRH-R1 transfizierten HEK-Zellen (Jahn et al., 2004) und in endogen CRH-R1 exprimierenden Hypophysenzellen (Lewis et al., 2001) der CRH-R1 in Folge einer Zugabe von hohen Konzentrationen von (ca. 100 nM) UCN2, aktiviert werden kann. Bei diesem Ergebnis ist jedoch zu bedenken, dass CRH in einer mindestens 100-fach niedrigeren Konzentration den CRH-R1 aktiviert und eine physiologisch relevante Bindung von UCN2 an CRH-R1 somit fraglich ist. I.c.v. Injektionen von UCN2 und UCN3 zeigen, dass diese Peptide Einfluss auf die Futteraufnahme, die motorische Aktivität und das Angstverhalten von Ratten haben (Inoue et al., 2003; Ohata and Shibasaki, 2004; Reyes et al., 2001; Valdez et al., 2002; Zorrilla et al., 2004). UCN3 i.c.v. appliziert, führt bei der Ratte im eigenen Käfig und im OF zu reduzierter Lokomotion. Dennoch zeigen die Ratten ein vermindertes ängstliches Verhalten, was durch vermehrtes Aufhalten auf den offenen Armen der EPM und reduziertes Putzverhalten im OF gezeigt werden konnte (Ohata and Shibasaki, 2004; Valdez et al., 2003). Darüber hinaus gehen sie schneller in den hellen Bereich einer *Dark/Light Box* (Venihaki et al., 2004). Im Vergleich dazu führt die Applikation von UCN bezüglich des Angstverhaltens zu einem konträren Ergebnis. UCN aktiviert, i.c.v. verabreicht, wahrscheinlich nicht nur den CRH-R2, sondern wie schon vorher vermutet, auch den CRH-R1 und ruft daher ein gesteigertes angstähnliches Verhalten hervor.

Mit UCN2 behandelte Ratten zeigen tagsüber eine reduzierte Aktivität und auf der EPM eine erhöhte Tendenz, sich auf dem offenen Arm aufzuhalten (Valdez et al., 2002; Zorrilla et al.,

2004). Die UCN2 Applikation führt daher eher zu einem reduzierten ängstlichen Verhalten, so wie auch UCN3. Zudem konnte man feststellen, dass durch die Gabe von UCN2 i.c.v. ein reduziertes Fress- und Trinkverhalten ausgelöst wird (Hsu and Hsueh, 2001; Inoue et al., 2003; Ohata and Shibasaki, 2004; Reyes et al., 2001; Zorrilla et al., 2004). Diese Tiere nehmen Futter und Wasser in kleineren Portionen zu sich (Inoue et al., 2003). Es wird vermutet, dass dies an einer verlangsamten Magenentleerung liegt. UCN2 sowie CRH i.c.v. verzögern nachweislich die Magenentleerung (Million et al., 2002). Die Darmbewegung wird indes durch die Verabreichung von UCN2 oder CRH, nicht aber von UCN3 erhöht (Martinez et al., 2004a; Martinez et al., 2002). Neueste Studien mit einer UCN2-*knock out* Maus zeigen, dass bei den UCN2-*knock out* Weibchen ein verändertes Futteraufnahme- und Trinkverhalten zu beobachten ist. Diese Tiere trinken und fressen zwar kumulativ über den Tag hinweg gesehen genauso viel wie Wildtypweibchen, doch fehlt der durch den circadianen Rhythmus bedingte frühabendliche Anstieg an konsumierter Wassermenge. Die erhobenen Daten zur Bestimmung der Stresshormone zeigen bei Weibchen, dass es auch hier zu Tagesrhythmusbedingten Veränderungen kommt. UCN2-*knock out* Weibchen zeigen abends erhöhte ACTH- und Corticosteron-Werte, aber morgens und nach Stress sind diese Werte vergleichbar mit Wildtyptieren. Auch in Verhaltenstests, die depressionsähnliches Verhalten untersuchen, konnte man bei UCN2-*knock out* Weibchen feststellen, dass sie ein reduziertes depressionsähnliches Verhalten aufweisen. Sie sind im *Forced swim* Test und *Tail suspension* Test weniger immobil als Kontrolltiere. Bei UCN2-*knock out* Männchen konnte man diese Veränderungen nicht feststellen. UCN2 scheint mit dem weiblichen Hormon Östrogen in einer Tagesrhythmus-abhängigen Beziehung zu stehen. Dieser Zusammenhang konnte anhand von UCN2-*knock out* Weibchen, denen man die Ovarien entfernt hatte, gezeigt werden. Denn die erhöhten *knock out*-bedingten ACTH und Corticosteron Werte konnten durch die Eierstockentnahme wieder reduziert werden (Chen et al., 2006).

Außerdem werden vasodilatatorische Effekte von UCN2 und UCN3 beschrieben (Wiley and Davenport, 2004). Zusätzlich führt die Injektion von UCN3 i.c.v. zu einer Erhöhung des Blutdrucks und der Herzfrequenz in der Ratte (Chen et al., 2004). UCN2 und UCN3 nehmen offensichtlich an der Regulation des Herzkreislaufsystems teil. Ihre genaue Rolle in diesem System ist bis jetzt noch nicht geklärt. Dass dieser Einfluss über den CRH-R2 vermittelt werden kann, zeigen Analysen von CRH-R2-*knock out* Mäusen, die einen erhöhten Blutdruck und ein stärker verzweigtes und dichteres vaskuläres Netzwerk als Wildtypmäuse aufweisen. UCN2 ist nicht nur am Metabolismus, d.h. an der Futtermittelverwertung und am Herzkreislaufsystem beteiligt, sondern spielt auch eine Rolle in der Ausbildung und Erhaltung

von Skelettmuskelgeweben (Hinkle et al., 2003). Mäuse, denen UCN2 verabreicht wurde, haben mehr Muskelmasse und eine erhöhte Muskelkraft. Außerdem kann der Muskelschwund, der bei anhaltender Ruhigstellung des Muskels auftritt, durch zusätzliche Gabe von UCN2 verringert werden (Hinkle et al., 2003).

Eine der interessantesten Studien zeigt, dass UCN2, in den dorsalen *Ncl. raphe* (DRN) injiziert, depressives Verhalten im erlernten Hilflosigkeitsmodell beeinflusst (Hammack et al., 2003a; Hammack et al., 2003b). Das erlernte Hilflosigkeitsmodell (*learned helplessness*) wurde erstmals von Seligman und Maier beschrieben (Seligman and Maier, 1967). Dabei postulieren sie, dass die Exposition von unberechenbarem und unkontrollierbarem Stress zu Depression führen kann. Im ursprünglichen Versuchsaufbau werden Ratten einem elektrischen Fußschock ausgesetzt, dem sie nicht entkommen und den sie auch nicht kontrollieren können. Am nächsten Tag werden diese Tiere wieder dem Stressor ausgesetzt, nur diesmal wird ihnen durch Drücken eines Hebels die Möglichkeit geben, dem elektrischen Schock zu entkommen. Tiere, die tags zuvor nicht der unkontrollierbaren Situation ausgesetzt waren, lernten schnell den Hebel zu drücken und dem Stressor zu entkommen. Gestresste Tiere zeigten weniger Motivation den aversiven Stimulus zu beenden. So führt erlernte Hilflosigkeit, genauso wie chronischer milder Stress, zu charakteristischen Symptomen einer Depression: kognitive Defizite, Appetitlosigkeit, Libidoverlust, Bewegungsarmut und Schlafstörungen (Porsolt et al., 1978; Sherman et al., 1979; Sherman et al., 1982). Die depressiven Effekte können aber durch Gabe von Antidepressiva, nicht aber durch andere Psychopharmaka, in diesen Tiermodellen wieder revidiert werden (Edwards et al., 1990; Lachman et al., 1993). Unkontrollierbarer Stress, wie elektrischer Fußschock oder Schwanzschock, führt zu einer differenziellen Aktivierung der serotonergen Neuronen im DRN und zu einem extrazellulären Anstieg von Serotonin sowohl im DRN als auch in den Projektionsregionen dieses Kerns (Amat et al., 1998; Maswood et al., 1998).

Viele der serotonergen Neuronen des DRN exprimieren auch den CRH-R2. Summers und seine Kollegen konnten zeigen, dass CRH sowohl das Verhalten bei erlernter Hilflosigkeit als auch die Feuerrate der serotonergen Neuronen im DRN verändert (Summers et al., 2003). Geringe Dosen von CRH können die Feuerrate der Neuronen erniedrigen (Kirby et al., 2000), hohe Dosen hingegen verstärken die Aktivität der Neuronen (Kirby et al., 2000; Lowry et al., 2000). Die Sensibilität dieses Systems auf CRH hängt jedoch nicht vom CRH-R1 ab, sondern von CRH-R2. Hammack und seine Kollegen konnten zeigen, dass der CRH-R1 Antagonist NBI27914 keinen Effekt auf die Reaktion auf unkontrollierbaren Stress hat. Der CRH-R2

Antagonist Antisauvagine-30 blockiert jedoch das normale Verhalten, hervorgerufen durch unkontrollierbaren Stress (Hammack et al., 2003a; Hammack et al., 2003b).

UCN2, injiziert in den DRN, führt zu einer erhöhten Feuerrate der serotonergen Neuronen und zu einer verstärkten Reaktion auf erlernte Hilflosigkeit und Angstkonditionierung. Die Tiere haben eine längere Latenz sich dem Stressor, in diesem Fall einem Schwanzschock, durch Flucht zu entziehen. Diese gesteigerte „Lethargie“ konnte durch den CRH-R2 Antagonisten reduziert werden (Hammack et al., 2003a; Hammack et al., 2003b).

Bei der Stimulation der serotonergen Neuronen durch unkontrollierbaren Stress kommt es in genau diesen Neuronen zu einer Erhöhung des *immediate early* Gens c-Fos. Durch die Injektion von UCN2 in den DRN der Ratte wird die Anzahl der Neuronen, die Serotonin und c-Fos synthetisieren erhöht (Staub et al., 2005). Somit konnte gezeigt werden, dass UCN2 serotonerge Neuronen im DRN aktivieren kann und darüber die Reaktion auf erlernte Hilflosigkeit moduliert. UCN2 kann also depressives Verhalten über die Aktivierung des CRH-R2 regulieren. Bei UCN2-*knock out* Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass der Serotonin Agonist *d*-fenfluramine, der die Ausschüttung von Serotonin unterstützt und den Wiederaufnahmemechanismus blockiert, das Fressverhalten in einer anderen Weise moduliert als bei Wildtypmäusen. Es kommt zwar bei der Gabe von *d*-fenfluramine zu einem dreistündigen anorektischen Effekt, aber die Hyperphagie, die normalerweise darauf folgt, bleibt bei den *knock out* Tieren aus. Die Serotonin Ausschüttung und UCN2 scheinen in Verbindung zu stehen, doch die genauen Mechanismen und die endogene Aufgabe von UCN2 sind noch nicht klar und müssen weiter erforscht werden.

2 Zielsetzung

Die physiologische Funktion des Neuropeptids UCN2 soll in dieser Arbeit *in vivo* näher untersucht werden. Zu diesem Zweck soll mittels *gene targeting* eine konditionale *gain-of-function* Mausmutante generiert werden, die es erlaubt UCN2 gewebs- oder zelltypspezifisch in verschiedenen Dosierungen überzuexprimieren. Diese konditionale Überexpression von UCN2 soll durch Kombination der Eigenschaften des Cre/loxP Systems mit dem ubiquitär exprimierten *Rosa26* Locus erreicht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es dann die Auswirkungen einer Überexpression von UCN2 im Zentralen Nervensystem der Maus zu untersuchen. Die Überexpression im Gehirn soll durch die Verpaarung der UCN2-OE Mauslinien mit *Nestin-Cre* Mäusen erreicht werden. Die auf diese Weise generierten Mäuse sollen zunächst auf die Funktionalität des konditional überexprimierenden Systems hin überprüft und anschließend phänotypisiert werden. Im speziellen sollen die Veränderungen im Expressionsmuster CRH-verwandter Gene im Gehirn, Veränderungen im Stresshormonhaushalt, im Fressverhalten, in der Verdauung, im Unterhaut- bzw. Körperfettgewebe sowie im Verhalten Gegenstand der Untersuchung sein. Mit diesen Ergebnissen soll ein Beitrag zur Aufklärung der physiologischen Rolle von UCN2 und dessen Beteiligung bei angst- und depressionsähnlichem Verhalten geleistet werden.

3 Material

3.1 Puffer und Lösungen

6x Agarosegelladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanol 15% Ficoll
Agarosegele	0,7% - 2% Agarose 0,1 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer
Agarmedien	1,5% Bacto Agar in dem jeweiligen Flüssigmedium
Ampicillinstammlösung	50 mg/ml Ampicillin
DEPC-H ₂ O	2 ml DEPC ad 2 l ddH ₂ O, kräftig schütteln, 4 h RT, 2x autoklaviert
Denaturierungspuffer	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA (pH 8,0)
Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Hybridisierungsmix (<i>in situ</i>)	50 % deionisiertes Formamid 20 mM Tris-HCl pH 8.0 300 mM NaCl 5 mM EDTA pH 8.0 10 % Dextransulfat 0.02 % Ficoll 400 0,02 % PVP40 0.02 % BSA 0,5 mg/ml tRNA 0,2 mg/ml Heringssperma DNA 200 mM DTT
LacZ-Fix-Lösung	4% PFA in PBS (pH 7.4) 0.005 M EGTA 0.001 M MgCl ₂
LacZ-Waschpuffer	0.002 M MgCl ₂ 0.01% Deoxycholate 0.02% NP40 PBS, pH 7.4

LacZ-Färbelösung	0.1% X-Gal (Stock-solution in DMF) 0.005 M Ferrocyanide 0.005 M Ferricyanide diluted in lacZ wash buffer
LB-Medium (Luria-Broth Medium)	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl
Lysispuffer	50 mM HEPES (pH 7,5) 150 mM NaCl 1% Triton X-100 10% Glycerol
Neutralisierungslösung	0.5 M Tris/HCl pH 7.5 5 mM EDTA pH 8.0
NTE, 5x	2.5 M NaCl 50 mM Tris-HCl pH 8.0 25 mM EDTA
Paraformaldehydlösung	4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4)
PBS-Lösung	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
SSC 20x (<i>saline sodium citrate</i>)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat 1 ml/l DEPC; 2x autoklavieren
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TSS (<i>Transformation and Storage Solution for chemical transformation</i>)	85% LB Medium 10% PolyEthylenGlycol (Gew. %, MW 8000) 5% DMSO (Vol. %) 50 mM MgCl ₂ (pH 6.5)
Lösungen für ES-Zellkultur	
Feeder-Medium	500 ml DMEM 57 ml FCS for feeders 5,7 ml L-Glutamin 200 mM 5,7 ml MEM non essential amino acids (100x)

ES-Zell Medium	500 ml DMEM 75 ml FCS for ES cells 9 ml L-Glutamin (200 mM) 12 ml Hepes (1 M) 6 ml MEM non essential amino acids (100x) 1,2 ml β -Mercaptoethanol (50 mM) 90 μ l LIF (10^7 U/ml) Für die Selektion 543 μ l G418 200 mg (aktives)/ml für eine Flasche Medium und/oder Gancyclovir mit einer Endkonzentration von 2 μ M
Einfriermedium	5 ml FCS 3 ml ES Zellmedium 2 ml DMSO
Lysispuffer	<i>Stocklösungen:</i> <i>für 500 ml</i> 1 M Tris-HCl pH 7,5 5 ml 10mM 0,5 M EDTA pH 8,0 10 ml 10mM 5 M NaCl 1 ml 10 mM 20% Sarcosyl 12,5 ml 0,5% Proteinase K 20 mg/ml 0,6 ml/12ml 1 mg/ml
Präzipitationsmix	150 μ l 5M NaCl in 10ml eiskaltem 100% Ethanol
Restriktionsmix	<i>Stocklösung</i> <i>pro Well:</i> 0,1 M Spermidine 1,2 μl 10x Restriction buffer 3,0 μl RNase A 10 mg/ml 0,3 μl Enzyme (10-20 U/ μ l) 2,0 μl or 3 μl Water 23,5 μl Σ 30 μl

3.2 Chemikalien allgemein

Substanz	Bezugsquelle (Katalognummer)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (M6250)
Agarose	Invitrogen (15510-027)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (A9518)

Ampuwa [®] -H ₂ O	Fresenius (1654198)
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Co. (214010)
BES	Sigma-Aldrich (B4554)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (B7021)
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich (A7906)
Chloroform	Merck (1.02445)
Chloramphenicol	Sigma
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Roche Diagnostics (1969064)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (1.06586)
DTT (Dithiothreitol)	Merck (1.120.130.001)
DPX Einbettmedium	BDH, England
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (E5134)
Essigsäure	Merck (8.18755)
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich (A6404)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (E1510)
Ficoll	Amersham Pharmacia (17.0400)
Formamid	Roth (6749.1)
Glutaraldehyd (25%)	Sigma-Aldrich (G5882)
Glycerol	Sigma-Aldrich (G7893)
Glycin	Sigma-Aldrich (G8790)
Glutathione, reduziert	Sigma-Aldrich (G4251)
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth (2316.2)
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich (I3021)
Isopropanol	Roth (6752.2)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (1.04873)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (K0879)
Kresylviolett	Merck (5235)
Lauryl Sulfat (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (L4509)
Minimal SD Base	Clontech (8602-1)
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich (L4158)
Minimal SD Base	Clontech (8602-1)
N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich (L5125)
Polyethylen Glycol	Sigma-Aldrich (P2139)
Reduziertes Glutathione	Sigma-Aldrich (G4251)
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe (0016.2)
Trichlormethan/Chloroform	Roth 3313.2
Triethanolamin	Sigma-Aldrich (T1377)
Tris (Trishydroxymethyl-aminoethan)	Roth
TRIZOL	Invitrogen (15596)
Tween-20	Bio-Rad (1706531)

X- α -Gal	Clontech (8061-1)
YPD-Medium	Clontech (8601)

3.3 Material für ES-Zellkultur

Produkt	Bezugsquelle	Bestellnummer
Lösungen		
DMEM	Life Technologies	#41966029
FCS für ES-Zellen	PAN Biotech	#220821
FCS für Feeder	Life Technologies	#10437-028
Glutamin	Life Technologies	#25030024
PBS	Life Technologies	#14190094
LIF	Chemicon Intern.	#ESG 1107
Mitomycin C	Sigma	#M-0503
β -Mercapto-ethanol	Sigma	#31350-010
G 418 Geneticin	Life Technologies	#11811
Gangcyclovir		
DMSO	Sigma	D 8418
Hepes 1M	Gibco	15630-056
Plastikware		
4-Well	Nunc	176740
6-Well	Nunc	150229
24-Well	Nunc	143982
48-Well	Nunc	150687
96-Well mit Lid	Nunc	149026
96-Well o.Lid./einz.verp.	Nunc	249662
96-Well Lids	Nunc	263339
Zellkulturschalen		
3,5 cm	Nunc	150318
6 cm	Nunc	150288
9 cm	Nunc	150350
14 cm	Nunc	168381

Einfrierröhrchen		
Nalgene klein, 1,2 ml	Nunc	5000-0012
Nalgene klein, 2 ml	Nunc	5000-0020

Enzyme	Bezugsquelle (Katalognummer)
DNase I, RNase –frei	Roche Diagnostics (84105421-23)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (P6556)
Restriktionsenzyme mit 10x Puffer	NEB, Fermentas
RNase A	Roche Diagnostics (109142)
RNase H	Invitrogen (18021-014)
RNasin	Roche Diagnostics (3335399)
Superscript™ II Plus Reverse Transkriptase	Invitrogen (18064)
T3- RNA-Polymerase	Roche Diagnostics (1031663)
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics (881767)
T4 DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (481220)
Taq DNA-Polymerase	Roche Diagnostics (1647679)
Kits	
Megaprime DNA Labeling System	Amersham Bioscience (RPN1604)
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (28706)
QIAquick Spin Miniprep Kit	Qiagen (27106)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (74104)
TOPO TA Cloning Kit pCRII Topo	Invitrogen (450640)
Wizard Midiprep DNA Purification System	Promega (A7640)
ImmuChem™ Double Antibody hACTH	MP Biomedicals (07-106101)
ImmuChem™ Double Antibody Corticosteron	MP Biomedicals (07-120102)

Nukleotide/Nukeinsäuren	Bezugsquelle (Katalognummer)
α - ³² P-dCTP	Amersham
α - ³² S-UTP	Amersham
Desoxynukleotide	Roche Diagnostics (1277049)
DNA-Längenstandards: Smart Ladder 1 Kb Plus DNA Ladder	Eurogentec, Belgien (MW-1700-02) Invitrogen (10787-018)
Lachssperma-DNA	Roche Diagnostics (85346024-39)
RNA Ladder	Invitrogen (15623-010)
Ribonukleotide	Roche Diagnostics (85730020-50)
tRNA	Roche Diagnostics (84694421-87)

3.4 Geräte allgemein

Gerät	Bezugsquelle (Katalognummer)
Autoklav Typ 24	Melag, Berlin
Biofuge pico	Heraeus Instruments
Concentrator 5301	Eppendorf
Elektrophoresezubehör	MWG Biotech
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Pharmacia
Entwicklermaschine (XP2000)	3M/Kodak
Geldokumentationssystem BioDoc	Biometra
Gelkammern	MWG Biotech
Gene Pulser II	BioRad
GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer
Heizblöcke Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
J2-MC-Zentrifuge	Beckmann
JLA 16.250-Rotor	Beckmann
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf
Kryostat HM 560	Microm, Walldorf
Megafuge 1.0 R	Heraeus
pH-Meter pH 538	WTW, Weilheim
Photometer GeneQuant II	Amersham
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN	Seral, Ransbach-Baumbach
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Schüttler SM25	Edmund Bühler
β-Counter	Beckmann Instruments, USA
Spectrophotometer DU 640	Beckmann
UV Stratalinker 4000	Stratagene
Vortex MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Waagen 40SM-200A/LP 4200S	Precisa, Dietkon, Schweiz/Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	GFL, Burgwedel Julabo
MRT	7T BRUKNER Biospec System

3.5 Primer

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion syntetisiert und für die PCR zur Genotypisierung und Kolonierung verwendet.

Oligonukleotid Name	Sequenz
Rosa 1	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
Rosa 2	GCGAAGAGTTTGTCCCTCAACC
Rosa 5	TAGAGCTGGTTCGTGGTGTG
Rosa 6	GCTGCATAAAACCCAGATG
Rosa 7	GGGGAACTTCCTGACTAGGG
Cre F	GATCGCTGCCAGGATATACG
Cre R	CATCGCCATCTTCCAGCAG
Rosa 26-5'F	TTCCTGCTACCAGG
Rosa 26-5'R	ATAAGTGTGGGGCGGTGG
Rosa 26-3'F	GTTGAGCCACTGAGAATGG
Rosa 26-3'R	ACAAACACTTCTACATGTCAG

3.6 Plasmide

Plasmid	Restriktionsenzym für Sondenfragment
Rosa26-5'	XhoI (180bp)
Rosa26-3'	EcoRI (700bp)
Cre-Sonde	XbaI/MluI (1500bp)
CRH-ISH-Sonde in Topo	SpeI (sense) EcorV (antisense)
CRHR1-ISH-Sonde in Topo	XhoI (sense) XbaI (antisense)
CRHR2-ISH-Sonde in Topo	BamHI (sense) XbaI (antisense)
UCN2-ISH- Sonde	XhoI (sense) BamHI (antisense)
UCN3-ISH-Sonde in Topo	XbaI (sense) HindIII (antisense)
UCN-ISH-Sonde in Topo	XhoI (Sense) HindIII (antisense)

3.7 Zelllinien

3.7.1 EMFI

Neomycin resistente embryonale Fibroblastenzellen aus der Maus (EMFI) „Feeder-Zellen“ (von S. Bourrier, IDG/GSF)

3.7.2 ES-Zellen

TBV2 (129 SvP) ES-Zellen (von S. Bourier, IDG/GSF)

3.7.3 Mauslinien

Nestin-Cre Mauslinie stammt von R.Klein (MPI für Neurobiologie, Martinsried)
C57BL/6J Mäusen stammen aus der hauseigenen Zucht, mit ursprünglichen Ausgangstieren
von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland)

4 Methoden

4.1 Herstellung des Targeting Vektors

4.1.1 Mikrobiologisch-bakteriologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter möglichst sterilen Bedingungen neben einer Bunsenbrennerflamme durchgeführt. Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert, Lösungen wurden ebenfalls durch Autoklavieren oder Filtration sterilisiert.

4.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien für die Transformation per Hitzeschock

Für Routine-Klonierungen von Plasmiden wurden kompetente *E. coli* DH5 α - oder XL1-Blue-Zellen benutzt, die nach einem Verfahren nach Chung et al. (Chung et al., 1989) mit TSS (*transformation* und *storage solution*) hergestellt wurden.

Eine 100 ml-Kultur (vorgewärmtes LB-Medium) wurde mit 1 ml einer frischen über Nacht Kultur (ü. N.-Kultur) von *E. coli* DH5 α - oder XL1-Blue-Bakterien angeimpft und bei 37°C und 175 U/min geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,3-0,4 erreicht war. Danach wurden die Zellen 10 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TSS aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen wurden nach dieser letzten Behandlung entweder direkt für die Transformation verwendet oder als 250 μ l-Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und schockgefroren. Dazu wurden die Reaktionsgefäße in mit Ethanol überschichtetes Trockeneis gestellt. Die weitere Lagerung kompetenter Zellen erfolgte bei -80 °C.

Alle Lösungen und Geräte bei dieser Prozedur wurden vorgekühlt, um eine hohe Transformationseffizienz beim Einsatz der kompetenten Bakterien zu ermöglichen.

Die Kompetenz der *E. coli* Zellen wurde durch Transformation von 0,1 ng und 1 ng pBluescript-DNA ermittelt. Die Effizienz beträgt in der Regel 1-4 x 10⁶ Kolonien/ μ g Plasmid-DNA.

4.1.3 Transformation kompetenter E. coli-Bakterien per Hitzeschock

250 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 ng eines Plasmids oder 10 μ l eines Ligationsansatzes (entsprechend ca. 25 ng Vektor) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurden die Zellen für 45s in einen auf 42°C eingestellten Heizblock transferiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Bakteriensuspension mit 800 μ l SOC-Medium versetzt und für 1h bei 37°C geschüttelt. Dann wurden zwei unterschiedliche Volumina, in der Regel 50 μ l und 250 μ l, auf LB-Agarplatten, mit entsprechendem Antibiotika zur Selektion, ausplattiert. Bei Verwendung von Vektoren, die die α -Komplementation des LacZ-Gens erlauben, wurden zusätzlich vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 μ l 4%ige X-Gal-Lösung auf der Plattenoberfläche verteilt.

Die Bakterienkulturen wurden ü. N. bei 37°C inkubiert, um das Wachstum von Kolonien zu ermöglichen. Die Platten befanden sich dabei in einer invertierten Position (Agar oben). Anschließend wurden mit einer Anzahl der Kolonien (6-24 Stück) 5 ml-Flüssigkulturen beimpft und diese ü. N. inkubiert. Im Falle des Tests auf α -Komplementation wurden nur weiße Kolonien verwendet, in denen das LacZ-Gen des Vektors durch die Insertion unterbrochen ist.

4.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Minipräparation mit dem "QIAGEN Spin Miniprep Kit" (alkalische Lyse).

Eine einzelne Bakterienkultur wurde in 5 ml LB-Medium ü. N. kultiviert und anschließend 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das detaillierte Protokoll für die Plasmidpräparation kann dem Handbuch (QIAPrep Miniprep Handbook 05/2004, S. 23) entnommen werden.

4.1.5 Midipräparation mit dem "Wizard Plus Midipreps DNA purification system" (Promega)

Um Plasmid-DNA in größerem Maßstab zu isolieren, wurde eine Bakterienkolonie ü. N. in 50-100 ml LB-Medium kultiviert. Das detaillierte Protokoll für die Plasmidpräparation kann dem Handbuch (TB173, Promega) entnommen werden.

4.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit"

Diese Methode der DNA-Isolierung aus Agarose basiert auf dem unterschiedlichen Adsorptionsverhalten von DNA gegenüber Silikatperlen, in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH-Wert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktions Kit eluiert. Das Protokoll kann dem Handbuch (QIAquick Spin Handbook 07/2002, S. 18) entnommen werden.

4.1.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von RNA und DNA erfolgte photometrisch. Es wurden geeignete Verdünnungen der Nukleinsäuren angesetzt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Gesamt-DNA bzw. RNA-Konzentration wurde wie folgt quantifiziert:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g DNA/ml bzw. } 40 \text{ } \mu\text{g RNA/ml}$$

$$\text{Konzentration der DNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Konzentration der RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

4.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g/ml}$) zugefügt. Die flüssige Agaroselösung wurde in eine Gelkammer gegossen, welche in eine Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt wurde. Die DNA-Proben wurden mit dem DNA-Ladepuffer versetzt und in die ausgehärteten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 40-120 V für 1-24 h je nach Fragmentgröße in 1x TAE Laufpuffer. Die DNA wurde dann mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

4.1.9 Restriktionsverdau

Die beim Restriktionsverdau eingesetzten Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA sequenzspezifisch schneiden. Sie wurden z. B. eingesetzt, um die Anwesenheit bestimmter Sequenzen in DNA-Molekülen zu überprüfen, um ringförmige Plasmid-DNA vor deren Einsatz als Matrize für die *in vitro*-Transkription zu linearisieren und um Fragmente von verschiedenen DNA-Molekülen mit spezifischen überhängenden Enden herzustellen, die anschließend ligiert wurden.

Restriktionen von DNA erfolgten in der Regel mit dem Zehnfachen der theoretisch benötigten Aktivität an Enzym in dem vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffer bei der für das Enzym optimalen Temperatur. Ausnahmen von dieser Regel waren partielle Verdauungen und die Anwendung von Enzymen mit hoher unspezifischer Aktivität; in diesen Fällen wurde erheblich weniger Enzym eingesetzt und kürzer verdaut. Erfolg und Vollständigkeit von Restriktionsverdauen wurden per Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

4.1.10 Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation in einen linearisierten Plasmid-Vektor wurde das zu ligierende DNA-Fragment dem geschnittenen Vektor in 2-10-fachem Überschuss in den Reaktionsansatz zugegeben. Die Möglichkeit einer Religation des Vektors wurde durch Erhöhung der Insert-Konzentration oder durch Dephosphorylierung des Vektors vermindert. Die Reaktion fand in einem Volumen von 10 µl statt. Dem Ligationsansatz wurden 1 x LB-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 16°C, um die Aktivität des Enzyms zu verlängern.

4.1.11 Ligation mit dem TOPO-TA-Klonierungskit

PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden über den von der Taq-Polymerase erzeugten 3'-A-Überhang in den pCRII-Vektor (Invitrogen, San Jose, USA) ligiert und nach der Vorschrift des Herstellers in TOP10F oder TOP10F'-Zellen des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen) transformiert. Erfolgreich ligierte Transformanten wurden mit Hilfe der Blau/Weiß- Selektion identifiziert.

4.1.12 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) ist eine enzymatische Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Als Polymerase wurde je nach Erfordernissen Taq (Roche) oder Herculase™ (Stratagene) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wie die Anlagerungs-/Schmelztemperatur (T_m) der Primer, die Mg^{2+} -Konzentration (CMg^{2+}) und die Extensionszeit wurden für jedes Primerpaar und die jeweilige Matrize optimiert.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt in einem Volumen von 50-100 μ l angesetzt:

1x	10x Reaktionspuffer
10 μ mol	dNTPs
10 pmol	Primer <i>forward</i>
10 pmol	Primer <i>reverse</i>
1-2,5 U	Polymerase
10-50 ng	DNA

$MgCl_2$ ist im Reaktionspuffer meistens enthalten, ansonsten wurde dem Ansatz $MgCl_2$ zugegeben. Die PCR-Reaktion wurde dann in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	1 Zyklus	95°C	2 min
Denaturierung	25-35 Zyklen	95°C	30 sec
Annealing		50-65°C	30 sec
Elongation		72°C	30-90 sec
	1 Zyklus	72°C	10 min
Abkühlen	1 Zyklus	4°C	∞

Die *Annealingtemperatur* liegt ca. 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Die Dauer der Elongation ergibt sich aus der Größe des jeweiligen Amplifikationsprodukts (30 sec je 500 bp).

4.1.13 DNA-Sequenzierung und Computer-gestützte Sequenzanalysen

Bei den Sequenzierungen wurde die *dye deoxy terminator cycle sequencing*- Methode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Didesoxynukleotid-Terminatoren angewandt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma "Sequiserve", Vaterstetten, durchgeführt.

4.2 Methoden zur gezielten Manipulation eines Gens in ES-Zellen

Die zum *gene targeting* notwendigen Protokolle wurden im wesentlichen den Büchern „*GeneTargeting: A Practical Approach*“ (Joyner, 1993) und „*Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*“ (Hogan, 1994) entnommen und werden hier nur kurz dargestellt.

4.2.1 Kultivierung von embryonalen Stammzellen auf EMFI – Zellen

Murine embryonale Stammzellen der Linie TBV2 aus B16 Mäusen und die Feeder-Zellen wurden freundlicherweise von Susanne Bourier zur Verfügung gestellt.

Die ES-Zellen wurden in Wachstumsmedium für ES-Zellen auf 10 cm – 6 cm Zellkulturschalen oder auf 96-well Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die ES-Zellen wurden zur Erhaltung ihrer Pluripotenz auf mitotisch inaktivierten primären, embryonalen Mausfibroblasten (EMFI, Feeder-Zellen) kultiviert und zusätzlich täglich mit LIF-haltigem Medium versorgt und jeden zweiten Tag vereinzelt und „gesplittet“, d.h. je nach Dichte verdünnt und neu ausgesät.

Um Feeder-Zellen herzustellen, wurden Mausembryonen (Tag 13 - 15) ohne Köpfe durch ein Kunststoffsieb in Medium für EMFI-Zellen passiert. Nach ungefähr einer Woche waren daraus die primären Fibroblasten gewachsen und konnten in Aliquots bei –135 °C in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

Zum Herstellen der Feeder-Schalen wurde ein Aliquot EMFI-Zellen aufgetaut, in 10 ml Wachstumsmedium für Feeder-Zellen gewaschen und auf fünf 15 cm Zellkulturschalen in 15 ml Feeder-Medium ausgesät. Nach etwa vier Tagen wurden die Zellen für 2 Stunden mit frischem Wachstumsmedium für Feeder-Zellen versetzt mit 10 µg/ml Mitomycin C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Trypsinieren vereinzelt

und dann in der jeweiligen Konzentration in Zellkulturschalen ausplattiert und für die Kultivierung von ES-Zellen bereit gehalten.

4.2.2 Ablösen und Vereinzeln von Zellen: Trypsinieren

Das Ablösen und Vereinzeln von ES-Zellen und Feeder wurde mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um inhibierende Medienbestandteile zu entfernen. Danach wurde Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, damit diese gerade bedeckt waren (z.B. 3 ml für eine 10 cm Schale). Nach 5 min Inkubation im Brutschrank und gelegentlichem Klopfen der Schale, um Zellaggregate mechanisch aufzulösen, wurde die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vollständig vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 1200upm) und in neuem Medium in der gewünschten Konzentration resuspendiert.

Tabelle für die eingesetzten Mengen für die jeweilige Zellkulturschale

<u>Durchmesser</u>	<u>Medium</u> <u>in ml</u>	<u>Trypsin</u> <u>in ml</u>	<u>Medium MMC</u> <u>Feeders</u>	<u>MMC Feeder</u> <u>Zellsuspension</u> <u>(2×10^5 cells/ml)</u>
Ø15cm	25	7	---	---
Ø10cm	10	3	7	3
6 well	2,5	0,5	2	0,5
4 well	1	0,1	---	1 ml (1:10 verd.)
24 well	1	0,1	---	1 ml (1:10 verd.)
48 well	0,5	0,05	---	0,5 ml (1:10 verd.)
96 well	0,150	0,03	--	150 µl (1:10 verd.)

4.2.3 Transfektion der embryonalen Stammzellen mit dem *Targeting-Vektor*

TBV2 ES Zellen wurden rasch im 37°C Wasserbad aufgetaut und in 10 ml ES-Zell Medium aufgenommen, pelletiert (5 min, 1200upm) und wieder in ES-Zellmedium resuspendiert. Ein

Aliquot eingefrorener TBV2 Zellen wurde auf drei EMFI beschichtete 10 cm Platten ausgesät und ca.5 Tage lang expandiert (siehe oben).

Zur Elektroporation wurden die ES-Zellen trypsiniert und in PBS ($1,5 \times 10^7$ Zellen/ml) aufgenommen und für 10 min auf Eis gestellt.

800 μ l dieser Zellsuspension wurden in eine Elektroporationsküvette überführt und mit 20 μ l linearisiertem Plasmid (1 μ gDNA/ μ l) versetzt und elektroporiert (Einstellungen 0.24 kV, 500 μ F für den „Bio Rad gene pulser“). Die Suspension wurde noch weitere 10-20 min auf Eis gehalten, bis die Zellen in 3 ml ES-Zell Medium (ohne Selektion) aufgenommen wurden und auf einer EMFI beschichteten 10 cm Platte ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde mit Hilfe von G418 (180 μ g (aktives)/ml) und Gancyclovir (2 mM) im ES-Zellmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. So konnten innerhalb einer Woche nur die ES-Zellklone überleben, die den *Targeting*-Vektor integriert haben.

Die Klone, die diese Selektionsphase überlebt hatten, wurden einzeln von der 10 cm Platte gepickt, in einer 96-Well Platte trypsiniert und dann in mit EMFI beschichtete 96-Well Platten überführt und im Brutschrank inkubiert.

Jede 96-Well Platte wurde nach ca. 2 Tagen so auf zwei neue EMFI beschichtete 96-Well Platten verteilt, dass die Dichte der einzelnen Klone in jedem Well annähernd gleich ist. Nach weiteren 2-3 Tagen wurden die Zellen erneut aufgeteilt, so dass eine Hälfte der Zellen auf Gelatine beschichtete 96-Well Platten und die andere auf EMFI beschichtete 96-Well Platten transferiert wurde.

Nach dem Anwachsen auf diesen Platten wurden die ES-Zellen, die auf EMFI beschichteten Platten wuchsen, trypsiniert, mit Einfriermedium eingefroren und bei -80°C gelagert. Die ES-Zellen, die auf Gelatine gewachsen waren, wurden mit PBS gewaschen, bei -20°C eingefroren und für die DNA Analyse zur Identifikation homolog rekombinierter ES-Zell Klone herangezogen.

4.2.4 Präparieren und Verdauen von genomischer DNA in 96-Well-Platten

Homolog rekombinierte ES-Zell-Klone wurden per Southern Blot identifiziert.

Zunächst wurde genomische DNA aus ES-Zellen, gewachsen auf Gelatine beschichteten Platten, direkt in 96-Well Platten isoliert. Hierzu wurden die konfluent bewachsenen Platten aufgetaut und mit 50 μ l Lysepuffer/Proteinase K versetzt. In einer feuchten Kammer wurden die Zellen ü. N. bei 54°C verdaut.

Am nächsten Tag wurden die Platten 1 min bei 2500 upm zentrifugiert und dann die DNA mit Hilfe eines eiskalten 100% Ethanol/NaCl Gemisches gefällt. Beim Schütteln für 1h bei Raumtemperatur wurde die DNA als weiße Fäden sichtbar.

Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (5 min. bei 4000 upm) und der Überstand abgekippt. Die Platten wurden auf Zellstoff ausgeklopft und die DNA dreimal mit je 150 µl 70 % Ethanol gewaschen.

Für den Restriktionsverdau wurde die DNA luftgetrocknet, um Ethanolreste abzdampfen und dann direkt in je 30 µl Restriktionsverdaumix gelöst. Der Ansatz wurde ü. N. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Bei Bedarf wurde am nächsten Tag nochmals frisches Restriktionsenzym zugegeben.

Positive, d.h. homolog rekombinierte ES-Zell Klone wurden mit Hilfe eines anschließenden Southern Blots identifiziert.

4.2.5 Expansion von positiven ES-Zell Klonen

Positive ES-Zell Klone wurden auf der 96-Well Platte identifiziert und expandiert. So wurden sie zuerst von der original 96-Well Platte auf eine frische 96-Well Platte übertragen. Nach Anwachsen auf dieser Platte wurden sie in eine 24-Well Platte transferiert und von dort auf eine 6 cm Platte, danach auf eine 10 cm Platte und dort wurden sie so lange herangezogen bis man min. vier 10 cm Platten des positiven Klons hatte.

Eine Platte wurde zur Injektion in Blastozysten verwendet, die anderen wurden eingefroren und im Stickstofftank gelagert.

4.3 Generierung chimärer Mäuse aus embryonalen Stammzellen

Die Herstellung von chimären Mäusen aus den manipulierten ES-Zellen wurden an der GSF, München-Neuherberg, in den Labors und Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Wolfgang Wurst im Institut für Entwicklungsgenetik durchgeführt.

Der Vorgang wird nur kurz beschrieben.

4.3.1 Induktion einer Superovulation in weiblichen Mäusen

Damit für die Experimente genügend Blastozysten gewonnen werden konnten, wurde bei C57BL/6 Mäusen durch Hormonbehandlung eine Superovulation induziert. Hierzu wurden

am Mittag des ersten Tages PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin) intraperitoneal injiziert, welches die Funktion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) nachahmt und zur Reifung besonders vieler Follikel führt. Am Mittag des dritten Tages wurde hCG (humanes Chorion-Gonadotropin) intraperitoneal injiziert, welches die Wirkung des luteinisierenden Hormons (LH) nachahmt und die Ovulation induziert, die dann in der darauf folgenden Nacht stattfindet.

4.3.2 Gewinnen von Blastozysten aus superovulierten Mäusen

Um Blastocysten zu gewinnen, wurden weibliche, superovulierte Tiere in der Nacht der Ovulation mit fertilen Männchen verpaart. Mittels *plug check* wurde am nächsten Morgen kontrolliert, ob es zur Verpaarung gekommen war. War dies der Fall, wurden 3,5 Tage post coitum die Tiere getötet und die Blastozysten aus dem Uterus gespült.

4.3.3 Sterilisierung von männlichen Mäusen und Generierung scheinträchtiger Ammentiere

Die Sterilisation männlicher Mäuse wurde durch Vasektomie erreicht. Scheinträchtige Mäuse wurden generiert, indem in der Östrusphase befindliche Weibchen mit sterilen Männchen verpaart wurden. Der Uterus des Tieres wurde dadurch aufnahmebereit für befruchtete Eizellen, während aber zugleich die eigenen unbefruchteten Eizellen degenerierten.

4.3.4 Injektion der homolog rekombinierten ES-Zellen in Blastozysten

Zehn Tage vor der geplanten Blastozysteninjektion wurden die ausgewählten ES-Zell-Klone aufgetaut und expandiert.

Eine Einzelzellsuspension von positiven ES-Zellen wurde in frisch gewonnene Blastozysten mikroinjiziert. Hierfür wurde ein Versuchsaufbau mit mikromanipulierbaren Glaskapillaren unter Mikroskopkontrolle verwendet. Nach der Injektion der ES-Zellen wurden die Blastocysten noch einige Stunden *in vitro* kultiviert, bevor sie in scheinträchtige Ammentiere implantiert wurden.

4.3.5 Implantation der Blastozysten in scheinträchtige Ammentiere

Mit ES-Zellen injizierte Blastozysten wurden in den Uterus von 3,5 Tagen postcoitum scheinträchtigen Tieren implantiert, wie dies in (Hogan, 1994) beschrieben ist.

Auf dem Rücken der narkotisierten Tiere wird bei dieser Methode ein ca. 1 cm langer Schnitt in Höhe der untersten Rippe angebracht, durch den Eierstock, Eileiter und ein Teil des Uterus nach außerhalb des Körpers gebracht werden. Mit Hilfe einer 26-gauge-Kanüle werden Öffnungen in beide Uterushörner gestochen, durch die mit Hilfe einer Transferkapillare ungefähr acht Blastozysten eingespült werden, von denen sich im Durchschnitt sechs erfolgreich einnisten und weiterentwickeln.

4.3.6 Auswahl der Chimären und Aufzucht von genveränderten Mäusen

Anhand der Fellfarbe konnte man den Anteil an erfolgreich in den frühen Embryo integrierten ES-Zellen abschätzen. Chimären, die einen Fellfarbenschimärismus von min. 40% aufwiesen, wurden zur Zucht mit C56/BL6 Mäusen verwendet.

Haben sich die Keimbahnzellen der Chimäre aus manipulierten ES-Zellen entwickelt, tragen die Nachkommen zu 50% die Genveränderung. Diese manipulierte Allel wurde durch Genotypisierung mit Hilfe von PCR und Southern Blot nachgewiesen.

4.4 Genotypisierung mittels Southern Blot

4.4.1 Isolation genomischer DNA

Um die gentechnisch veränderten Mauslinien zu genotypisieren, wurde genomische DNA aus deren Schwanzgewebe gewonnen. Die Isolation erfolgte mit dem "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" von Promega und dem dazugehörigen Protokoll (Bedienungsanleitung Version 050, Protokoll D. 3). Im Anschluss an die Isolation wurde die rehydrierte DNA bei 4°C oder -20°C aufbewahrt und konnte dann für die Analyse mittels PCR oder Southern Blot verwendet werden.

4.4.2 Restriktionsverdau und Elektrophorese

Es wurden 10-20 µg der DNA mit 60 U des entsprechenden Enzyms in einem Volumen über Nacht verdaut. Die DNA Proben wurden auf ein 0.8%iges Agarosegel aufgetragen und bei

40V über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit einem beiliegenden Lineal unter UV-Licht fotografiert.

4.4.3 DNA-Transfer (Southern Blot)

Vor dem Transfer wurde die DNA in dem Gel unter leichtem Schütteln für 30 min in einer Denaturierungslösung denaturiert und anschließend zweimal 15 min in einer Neutralisierungslösung neutralisiert. Für den Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde eine Blotapparatur, wie in folgender Abbildung dargestellt, aufgebaut:

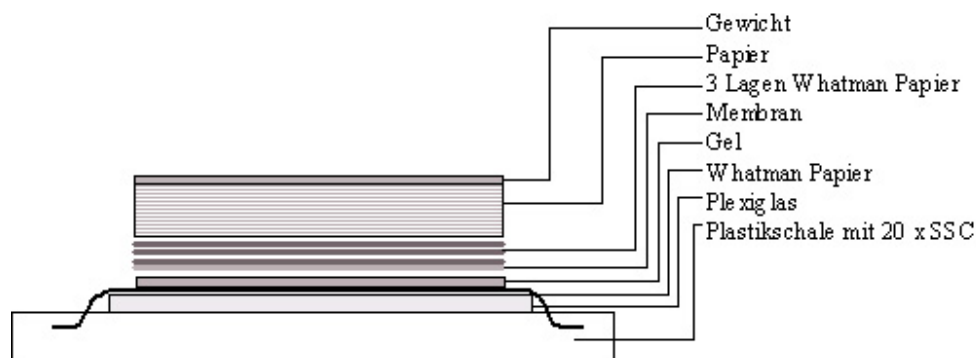


Abb. 7: Aufbauschema eines Southern Blots

Der Transfer erfolgt 12-24 h. Anschließend wurden die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran wird abgenommen und auf Filterpapier getrocknet. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Bestrahlung immobilisiert.

4.4.4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden durch *random priming*

Mit Hilfe einer radioaktiv-markierten Sonde werden die DNA-Fragmente spezifisch markiert und können anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Für die Markierung der Sonden mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ wurde das *Megaprime DNA labelling system* der Firma Amersham verwendet. Die DNA-Sonde (50 ng) wurde zusammen mit 10 μl der Primerlösung für 5 min denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 5 μl des 10 x Reaktionspuffers, 2 Einheiten Klenow-Enzym sowie 50 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Endvolumen von 50 μl für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktion wurde der Ansatz über Microspin S-300 Säulen (Amersham) aufgereinigt. Um die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten Sonde zu bestimmen, wurde 1 μl der aufgereinigten Sonde in 2 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Beta-Counter

gemessen. Die Sonde sollte eine spezifische Aktivität von mehr als 1×10^8 cpm/ μ g DNA aufweisen und in der Hybridisierungsreaktion in mindestens 1×10^6 cpm/ml Lösung vorliegen. Anschließend wurden der Sonde 100 μ l Lachsspermin DNA zugegeben, der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt.

4.4.5 Hybridisierung von Nylonmembranen

Die Membran wurde zunächst in 5-10 ml "Rapid-hyb" Hybridisierungspuffer (Amersham) für 30 min bei 65°C prähybridisiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde hinzu gegeben und die Membran wurde für mindestens 4 Stunden bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran in 0,2x SSC/0.1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Radioaktivität der Membran wurde nach dem Waschvorgang mit einem Handmonitor überprüft und gegebenenfalls wurde der Waschschritt wiederholt. Anschließend wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt und über Nacht in einer Kassette mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionsdauer hängt grundsätzlich von der Stärke des zu erwartenden Signals ab.

4.4.6 Entfernung radioaktiver Sonden von hybridisierten Membranen (Strippen)

DNA-Sonden, die an die Membran gebunden sind, können entfernt werden, um diese mit einer weiteren Sonde zu hybridisieren. Dafür wurde die zuvor hybridisierte Sonde unter sehr stringenten Bedingungen in 0,1 x SDS bei 95°C von der Membran gewaschen.

4.5 Arbeiten mit Mausgewebe

4.5.1 LacZ Färbung von Mausgewebe

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis des Inhalationsnarkotikum Isofluran getötet. Danach wurden sie über eine intracardiale Kanüle zuerst mit PBS ca. 5 min und dann mit LacZ-Fix-Lösung ca. 10 min perfundiert. Das 4%ige Paraformaldehyd in der LacZ-Fix-Lösung bewirkt die Fixierung des Gewebes.

Danach wurden die Organe, wie Lunge, Leber, Niere, Herz und Gehirn entnommen, wenn notwendig mit Hilfe des Vibratoms geschnitten und in der LacZ Färbelösung über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Tiere wurden entweder durch Isofluran oder durch zervicale Dislokation getötet. Die Gehirne wurden nach der Entnahme sofort auf Aluminiumfolie transferiert, die auf Trockeneis gelegt wurde. Die so gefrorenen Gewebe konnten bei -80°C für längere Zeit gelagert werden.

Vor dem Schneiden wurden die gefrorenen Gewebe auf einem metallenen Präparathalter mit Hilfe von Einbettmedium befestigt. Die Gehirne wurden in einem Cryostat bei -14°C bis -20°C in einer Dicke von 16-20 µm geschnitten und nach dem Aufziehen auf den Objektträger auf einer Wärmeplatte bei 37°C getrocknet. Die so hergestellten Schnitte wurden in Plastikboxen bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4.5.3 *In Situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung (ISH) lassen sich Nukleinsäuren in der Zelle am histologischen Schnittpräparat (*in situ*) nachweisen. Bei der ISH werden einzelsträngige Nukleinsäuren, die mit einer Markierung (in unserem Fall ³⁵S) versehen wurden, als Sonden eingesetzt. Als Sonde können sowohl DNA-Sonden als auch RNA-Sonden eingesetzt werden. Wichtig ist, dass die Sonde die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA oder RNA aufweist. Die Sonde kann dann spezifisch an die Zielstruktur binden und im Schnitt lokalisiert werden.

4.5.4 Sondenmarkierung mit ³⁵S-UTP

Für die Sondenmarkierung per *in vitro*-Transkription wurden für einen einfachen Ansatz 1,5 µg linearisiertes Plasmid oder PCR Produkt mit 10x Transkriptionspuffer, 0,5 M DTT, rNTPs (jeweils 10 mM) und RNAsin (40 U) versetzt. Die Zugabe von ³⁵S-thio-rUTP sowie RNA-Polymerase (20 Units T3 bzw. T7 bei pT7T3-Vektor) bewirkte eine radioaktive Markierung der neu synthetisierten RNA, welche anschließend mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) aufgereinigt wurde. Die Aktivität der Sonde wurde bestimmt, indem 1 µl der Probe mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Beta-Counter gemessen wurde. Um

unspezifische Bindungen auf den Hirnschnitten zu überprüfen, wurde zusätzlich zu der *Antisense-Sonde*, welche komplementär zur zu untersuchenden mRNA ist, eine *Sense-Sonde* erstellt. Diese Sonde entspricht in ihrer Basensequenz der mRNA, sollte aber mangels Komplementarität keinen spezifischen Hybridisierungspartner finden.

Reaktionsansatz:

linearisierte Plasmid-DNA (1,5 µg)	x µl
10x Transkriptionspuffer	3 µl
rNTPs (jeweils 10mM)	3 µl
0,5 M DTT	1 µl
Rnasin (40 U/µl)	1 µl
³⁵ S-thio-rUTP	3 µl
T7 bzw. T3-Polymerase (20 U/µl)	1 µl
H ₂ O-DEPC	add 30 µl

4.5.5 Vorbehandlung der Cryo-Schnitte und Hybridisierung

Vor Beginn der Behandlung werden die Schnitte für ca. 30 min in der geschlossenen Box auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend werden die Präparate für 10 min in 4°C kaltem PFA (Paraformaldehyd 4% in 1x PBS) fixiert und zweimal für je 5 min in 1x PBS/DEPC gewaschen. Es folgt eine 10-minütige Acetylierung unter ständigem Rühren mit Essigsäureanhydrid (0,25% Essigsäureanhydrid in 1x Triethanolamin, TEA). Danach werden die Objektträger in 2x SSC/DEPC für 2x 5 min gewaschen und in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydriert (30%, 75%, 95% und 100%). Es folgt eine 1-min Behandlung mit Chloroform, welches mit 100% Ethanol wieder ausgewaschen wird.

Die Objektträger werden staubfrei getrocknet und anschließend mit 100µl Hybridisierungsmix, der 10000 bis 70000 cpm/µl der ³⁵S-markierten Sonde enthält, bedeckt und ein Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt. Die so behandelten Objektträger werden in einer Kammer, deren Boden mit einer Lösung aus Formamid (50%) und 2x SSC in DEPC-H₂O bedeckt ist, über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Hybridisierungstemperatur liegt ungefähr bei 25°C unter der Schmelztemperatur der Sonde. Je stringenter die Hybridisierungsbedingungen gewählt werden, umso schwächer wird der Hintergrund.

Die Vorbehandlung im Kurzprotokoll:

10 min	4 % PFA/PBS (4°C)
3 x 5 min	PBS/DEPC
10 min	0,1 M Triethanolamine-HCl (pH 8.0)
2 x 5 min	2x SSC/DEPC
1 min	60 % Ethanol/DEPC
1 min	75 % Ethanol/DEPC
1 min	95 % Ethanol/DEPC
1 min	100 % Ethanol
1 min	CHCl ₃
1 min	100 % Ethanol
1 min	95 % Ethanol/DEPC

4.5.6 Waschen

Zuerst werden die Deckgläser von den Objektträgern entfernt. Danach wird 4x 5 min in 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgt eine 20-minütige Inkubation mit RNaseA (50 µg/ml) in NTE-Puffer bei 37°C. Dann werden die Objektträger 5 min in 1x SSC/1mM DTT und 10 min in 0,5x SSC/1mM DTT gewaschen. Beide Waschschrte erfolgen bei Raumtemperatur. Es folgt eine 2x 30-minütige Behandlung bei 65°C in 0,1x SSC/1mM DTT.

Zuletzt werden die Schnitte in einer ansteigenden Ethanolreihe bei Raumtemperatur dehydriert und staubfrei getrocknet. Die Exposition der Schnitte findet in einer Filmkassette für 3-7 Tage statt.

Der Waschvorgang im Kurzprotokoll:

4 x 5 min	RT	4x SSC
20 min	37 °C	NTE (20µg/ml RNaseA)
2 x 5 min	RT	2x SSC/1 mM DTT
10 min	RT	1x SSC/1 mM DTT
10 min	RT	0,5x SSC/1mM DTT

2 x 30 min	64 °C	0,1x SSC/1 mM DTT
2 x 10 min	RT	0,1x SSC
1 min	RT	30 % Ethanol in 300 mM NH ₄ OAc
1 min	RT	50 % Ethanol in 300 mM NH ₄ OAc
1 min	RT	70 % Ethanol in 300 mM NH ₄ OAc
1 min	RT	95 % Ethanol
2 x 1 min	RT	100 % Ethanol

4.5.7 Quantifizierung der ISH Signale

Der Film wird eingescannt und die Hybridisierungssignale mit Hilfe des Programms „Scion Image“ quantifiziert. Die Schnitte können weiter behandelt werden, um die Sonde in den verschiedenen Hirnregionen sichtbar zu machen.

Die Quantifizierung erfolgt, indem die gewünschten Strukturen auf dem eingescannten Schnitt umrandet werden. Die durchschnittliche Intensität des markierten Bereichs wird von dem Programm gemessen (Schmidt et al., 2004). Die Hintergrundintensität wird ebenfalls bestimmt und von den zu quantifizierenden Werten abgezogen.

4.5.8 Nachweis der radioaktiven Sonden auf dem Schnitt durch Silberfärbung (*Dippen*)

Um die hybridisierte Sonde auf den Schnitten sichtbar zu machen, werden die Objektträger in KODAK NTB2 Emulsion getaucht und im Dunkeln getrocknet. Anschließend werden sie für 1 Tag bis 6 Wochen in lichtundurchlässigen Boxen bei 4°C gelagert. Nach dieser Zeit werden die Objektträger entwickelt, gewaschen und fixiert. Wenn nötig kann mit Kresylviolett gegengefärbt werden (Nissl-Färbung).

Kresylviolett-färbung

10-15 min	Kresyl-Violett
2 min	Wasser
2x 2 min	70 % Ethanol
15-30 sec	96 % Ethanol/Essigsäure
2x 1 min	96 % Ethanol
2x 2 min	100 % Ethanol
2x 5 min	Xylol

Nach der Färbung werden die Schnitte mit DPX-Einbettmedium bedeckt und mit einem Deckgläschen verschlossen.

4.6 Bestimmung von Stresshormonen im Blutplasma durch Radioimmunoassay

Das Blut zur Gewinnung des Blutplasmas wurde entweder aus dem retroorbitalen Venenplexus oder aus dem Torso der dekapitierten Maus entnommen. Für die retroorbitale Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isoluran anästhetisiert. Mit Hilfe einer dünnen Glaskapillare wurde der Venenplexus hinter dem Auge der Maus leicht verletzt, so dass ca. 300µl- 500µl Blut über die Kapillare in ein EDTA beschichtetes Reaktionsgefäß tropfen konnte. Bei der Blutentnahme aus dem Torso wurden die Mäuse bis zum Atemstillstand mit Isoluran betäubt und danach mit Hilfe einer Schere dekapitiert. Das austretende Blut wurde in einem EDTA beschichteten Reaktionsgefäß aufgefangen. Alle Blutproben werden sofort gekühlt und später bei 3500 upm für 15min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Blutplasma aus dem Reaktionsgefäß entnommen und bei -80°C aufbewahrt.

Das Prinzip des Radioimmunoassays (RIA) basiert auf der Konkurrenz zwischen ¹²⁵I-markiertem Corticosteron bzw. hACTH und nichtradioaktiv-markiertem Corticosteron bzw. hACTH in den Standards bzw. den zu messenden Proben um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Je mehr nicht-markiertes Antigen in den zu bestimmenden Proben bzw. Standards enthalten ist, desto weniger ¹²⁵I-markiertes Antigen kann von dem zugefügten Antikörper gebunden werden.

Nach einem Inkubationsschritt ist die Menge an markiertem Antikörper-Corticosteron-Komplex bzw. Antikörper-hACTH-Komplex umgekehrt proportional der Menge an unmarkiertem Corticosteron bzw. hACTH in den zu bestimmenden Proben.

Zur Abtrennung von Antikörper-gebundenen und freiem ^{125}I -Corticosteron bzw. ^{125}I -hACTH wird die Doppelantikörpermethode eingesetzt, wobei ein 2. Antikörper im Überschuss zugegeben wird. Durch Zentrifugieren wird der gebildete 2. Antikörper-Antikörper-Corticosteron/hACTH-Komplex abgetrennt, ungebundenes Antigen wird dekantiert und die Radioaktivität im Niederschlag des Teströhrchens mittels Gamma-Counters gemessen.

Das genaue Protokoll kann der Arbeitsanleitung des ImmuChemTM Double Antibody Corticosteron Kit bzw. ImmuChemTM Double Antibody humanes Adrenocorticotropes Hormon (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) entnommen werden.

4.7 Glucocorticoidmetaboliten Bestimmung aus den Exkrementen der Maus

Die Metaboliten wurden nach der Methode von Chadi Touma extrahiert und bestimmt.

Jede Kotprobe wurde homogenisiert und ein Aliquot von 0,05 g wurde mit 1 ml 80% Methanol versetzt und 30min auf dem Vortexer geschüttelt. Diese Emulsion wurde danach zentrifugiert (10min, 2.500xg) und ein Aliquot des Überstandes wurde mit Tris/HCl 20 mM, pH 7,5 verdünnt (1:10) und bei -20°C gelagert.

Um die Corticosteroidmetaboliten zu bestimmen wurde ein Enzymimmunoassay (EIA) mit einem Antikörper gegen 5α -pregnane- 3β , 11β , 21β -diol verwendet (Steraloids, Wilton, NH, USA).

Das genaue Protokoll kann aus der Veröffentlichung von (Touma et al., 2003) entnommen werden.

4.8 Tierhaltung und Hygienestatus

Die Tierräume befinden sich im MPI für Psychiatrie im Tierstall Beta. Sie sind mit belüfteten Schränken und Typ II Polycarbonat Käfigen ausgestattet. Pro Käfig werden maximal 5 Mäuse gehalten. Die Tiere sitzen auf hochwertiger Labortiereinstreu (Altromin, Typ $\frac{3}{4}$), der einmal wöchentlich gewechselt wird. Zusätzlich erhalten die Mäuse Nistmaterial. Die Haltung der Tiere erfolgt unter standardisierten klimatischen Bedingungen. In den Tierräumen herrschen $21 (+/- 1) ^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchte von $55 (+/- 5 \%)$. Diese Werte werden konstant

überwacht und aufgezeichnet. Der Lichtzyklus beträgt 12 Stunden (6:00 -18:00Uhr, mit einem Wechsel für die Sommerzeit). Die Tiere werden mit einer Standarddiät (Altromin 1314) *ad libitum* gefüttert. Sie erhalten kontrolliertes Münchner Leitungswasser *ad libitum* aus Spenderflaschen. Der Hygienestatus der Tiere wurde nach den aktuellen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) regelmäßig untersucht (Nicklas, Baneux et al. 2002).

4.9 Metabolismusbestimmungen an Mäusen

4.9.1 Futterkonsum Messung

Für die Analyse der Futtermenge wurden die Tiere einzeln in Typ II Käfige gesetzt und in einen anderen Raum transferiert. Während der Habituationsphase von min. zwei Wochen hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter.

Zur Bestimmung der gefressenen Futtermenge pro Tier, wurde jedes Tier um 8 Uhr morgens vor Beginn des Experiments in einen sauberen Käfig mit neuem Einstreu und Nistmaterial umgesetzt und eine definierte Menge Futter (ca. 50g) in die Futterraufe gefüllt. Anschließend wurde jeden Tag die verbleibende Futtermenge in der Raufe um 9 Uhr und um 17 Uhr gewogen. Aus der Differenz zwischen eingewogenem Futter und verbleibender Futtermenge konnte, unter Berücksichtigung möglicher Krümel am Käfigboden, die gefressene Futtermenge bestimmt werden.

Bei der Futterbestimmung, der ein Futterentzug vorausging, wurden die Mäuse um 17 Uhr in frische Käfige gesetzt, um mögliche Futterquellen am Boden des Käfigs auszuschließen und kein Futter für die Nacht in die Raufe zugegeben. Am nächsten Tag um 9 Uhr wurde den Mäusen wieder eine bestimmte Menge Futter angeboten und der Futterkonsum wurde jede Stunde durch Wiegen des verbleibenden Futters in der Raufe kontrolliert.

4.9.2 Kotbestimmung

Mäuse, die aus dem Futtersuch kamen wurden in Typ I Gitterkäfige umgesetzt. Die Gitterkäfige wurden auf Typ I Polycarbonat Käfige gesetzt. Der Boden des Polycarbonat Käfigs wurde mit einem saugfähigen Papier ausgelegt um den Urin der Mäuse aufzusaugen und die Kotproben aufzufangen. Die Mäuse erhielten eine definierte Menge an Futter und

Wasser zu der sie freien Zugang hatten. In diesen Käfigen war es aber nicht möglich den Tieren Nistmaterial oder Einstreu anzubieten.

Die Kotproben des ersten Tages wurden nach 24h eingesammelt, gezählt, gewogen getrocknet und eingefroren. Die Kotproben nach 7 Tagen Eingewöhnungsphase wurden wieder gesammelt, gezählt, gewogen, getrocknet und eingefroren und für die Corticosteron Metaboliten (CM) Bestimmung verwendet.

4.9.3 Fettmessung

Der intraabdominale Fettanteil wurde mittels Magnetresonanztomographie bestimmt. Die Tiere wurden hierzu ex-vivo in einem 7 T BRUKER Biospec System gemessen, wobei zur Darstellung des gesamten Körpers ein Volumenresonator verwendet wurde. Die Mäuse wurden auf dem Rücken liegend mit Leukoplastbändern fixiert. Zur optimalen Darstellung des Fett-/Gewebekontrasts fand eine T1-gewichtete Meßmethode Anwendung (2D spin echo, TR = 900 ms , TE = 11.6 ms, Bildmatrix 512 x 256, Scheibendicke = 1 mm, 34 Scheiben, Aufnahme Fenster 4.6 cm x 4.6 cm, 8 Mittelungen). Zur kompletten Abdeckung des zu untersuchenden Bereichs (Schwanz – Leber) wurden zwei teilweise überlappende Schichtpakete nacheinander aufgenommen. Mit den gewählten Aufnahmeparametern kann Fett deutlich kontrastreicher abgebildet werden als muskuläres Gewebe oder Organe. Freie Flüssigkeiten wie bspw. Urin kontrastieren ebenfalls dunkler. Zusätzlich zu der bildgebenden Methode wurde ein kurzes Magnetresonanzspektrum ohne Volumenselektion aufgenommen (pulse-acquire, 1 scan, ohne Wasserunterdrückung). In diesem Spektrum kann der relative Fett/Wasser Anteil aufgrund der chemischen Verschiebung dieser beiden Resonanzen (Wasser: 4.7 ppm, Fett: 1.2 ppm) durch Bestimmung der Peak-Integrale ermittelt werden (UXNMR, Bruker). Somit wird eine Abschätzung des Fettanteils im Vergleich zu sämtlichen wasserhaltigen Gewebetypen erreicht, jedoch ohne räumliche Differenzierung.

Die anatomischen Aufnahmen wurden mit Hilfe der Paravision-Software (Bruker, Germany) ausgewertet. Pro Schicht wurden manuell intraabdominal Regionen über einen kubischen Spline abgegrenzt. Subcutane, cutane und skelettale Gewebe ergeben sich invers. Zur Bestimmung von fetthaltigen Geweben wurde als Schwellwert für die Pixelintensität 50% der maximalen reinen Fettintensität (bspw. Subcutan) gewählt, was eine gute Differenzierung von Fett gegen andere Gewebearten erlaubt. Die einzelnen Fettanteile im viszeralen bzw. (sub-) cutanen Kompartiment wurden durch Summation der entsprechenden Pixelanzahlen oberhalb

des Schwellwertes über alle Schichten erhalten. Weitere Datenauswertung wurde in MS-Excel durchgeführt.

4.10 Verhaltensexperimente

Die zu testenden Mäuse wurden einzeln in Typ II Käfigen gehalten. Zwei Wochen vor den eigentlichen Experimenten wurden die Mäuse an den invertierten Tag-Nacht Zyklus (Dunkelheit ab 9:00 bis 21: Uhr) adaptiert. Die Experimente wurden nach den Vorschriften der Regierung Oberbayern „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ durchgeführt.

Alle Verhaltensexperimente wurden während der aktiven Phase im Dunklen zwischen 13:00 und 18:00 Uhr durchgeführt. Zwischen den verschiedenen Experimenten, die in folgender Reihenfolge durchgeführt wurden, waren min. zwei Tage Ruhepause: *Light/Dark Box*, *open field* Test, *tail suspension* Test (TST), *forced swim* Test (FST).

Das Verhalten beim TST und beim FST wurde direkt von einer geübten Person, die den Genotyp der Mäuse nicht kannte, beobachtet und analysiert.

4.10.1 Light/Dark Box

Die Tiere wurden in eine Box gesetzt, die in zwei gleiche Teile aufgeteilt wurde (26x13x38 cm). Ein Teil hat durchsichtige Plastikwände, einen weißen Boden der mit Hilfe einer Lichtquelle auf 700 Lux erhellt wird. Der andere Teil besteht aus schwarzem Plastik und wird zusätzlich durch einen schwarzen Deckel verdunkelt. Eine Öffnung von 7,5x 7,5 cm verbindet die beiden Kompartimente. Mit Hilfe von Infrarotsensoren (Abstand 1,52 cm, Aufzeichnungsgeschwindigkeit 4Hz) konnte die Aktivität der Mäuse in vertikaler und horizontaler Ebene detektiert und von einem Computer mit einer Tru Scan Software Vers. 1.1A (Coulbourn Instruments, Allentown, USA) erfasst werden. Die ganze Apparatur wird nochmals von einer 47x47x38 cm großen weißen Box umgeben.

Jeder Versuchsdurchlauf dauerte 30min, wobei die Maus zu Beginn in das Zentrum der dunklen Box gesetzt wurde. Während dieser Zeit wurde die gesamte zurückgelegte Strecke, die Zeit in der sich die Maus bewegte und in der sie verharrte und ihre vertikalen Bewegungen (*rearings*) in den einzelnen Kompartimenten gemessen. Außerdem wurde die Latenzzeit berechnet, die das Tier benötigte um zum ersten Mal in den hellen Teil einzutreten.

4.10.2 Open field

Die Tiere wurden für diesen Test in eine 26x26x38cm große Box gesetzt, die aus durchsichtigen Wänden und einem weißen Boden besteht. Die Bewegungen der Maus wurden mittels Infrarotsensoren (siehe oben) aufgezeichnet und über die Tru Scan Software Vers.1.1A (Coulbourn Instruments, Allentown, USA) ausgewertet.

Jeder Versuchsdurchlauf dauert 30min, wobei die Maus ins Zentrum der Box gesetzt wurde.

Es wurden die gleichen Parameter detektiert wie auch in der Light/ Dark Box.

4.10.3 Tail Suspension Test

Die Versuchstiere wurden am Schwanz mit Hilfe eines Klebestreifens ca. 35 cm über dem Boden an einem Stahlträger befestigt. Jeder Versuch dauerte 6 min und wurde per Video aufgenommen. Die Länge der Immobilität der Mäuse wurde über das Programm Eventlog 1.0 (Robert Hedersen, 1986) errechnet. Die Mäuse wurden dann als immobil registriert, wenn sie weder Beine noch Kopf bewegten.

4.10.4 Forced Swim Test

Jede Maus wurde in einen 5L Behälter (23,5 cm hoch, Durchmesser 16,5 cm), der min. 15 cm hoch mit 32 ± 1 °C warmem Wasser gefüllt war für 6 min gesetzt. Nach jedem Versuch wurde das Wasser ausgetauscht. Es wurde das Verhalten der Mäuse im Wasser nach folgenden Parametern beurteilt: wie viel Zeit verbringt die Maus in regungslosem Zustand (*floating*), wie viel im strampelnden (*struggling*). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Eventlog 1.0 ausgewertet.

Das Verhalten der Maus wurde dann als Floating gewertet, sobald die Maus aufhörte sich strampelnd oder schwimmend zu bewegen. Lediglich kleine Bewegungen durften durchgeführt werden, so dass der Mäusekopf über Wasser gehalten werden konnte. Das Verhalten der Maus wurde dann als *struggling* gewertet, wenn die Maus mit allen vier Extremitäten paddelte und dabei die Vorderpfoten die Wasseroberfläche durchbrachen.

Dieser Test wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung einer UCN2 überexprimierenden Mauslinie

5.1.1 Generierung der Mauslinie $R26^{\text{stopUCN2}/\text{stopUCN2}}$

Um eine universell einsetzbare, konditional UCN2 überexprimierende Mauslinie zu erhalten, wurde ein *knock in* in den *Rosa26* (*R26*) Locus generiert. *R26* wurde in einem *gene trap screen* als ubiquitär exprimierter Locus identifiziert, der sowohl im gesamten adulten Tier als auch in allen embryonalen Stadien der Maus exprimiert wird (Zambrowicz 1997). In diesen Locus eingebrachte Gene werden in jedem Zelltyp der Maus aktiviert (Sorinao 1999). UCN2 soll jedoch nicht ubiquitär, sondern konditional, d.h. nur in bestimmten Geweben bzw. Zellen der Maus, exprimiert werden. Daher wurde in den *R26* Locus eine spezielle Expressionskassette eingebracht. Zu Beginn dieser Kassette steht eine loxP flankierte transkriptionsterminierende Sequenz, die ein Neomycinresistenzgen und ein dreifaches *Poly-A* Signal enthält. Danach folgt die cDNA des UCN2 und anschließend ein IRES tau-LacZ Reportergen (StopUCN2-Kassette) (Abb. 7). Die Integration dieser Kassette erfolgt über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Aufgrund des Transkriptionsstopps werden zunächst weder UCN2 noch das tau-LacZ Reportergen exprimiert. Es kommt also zu einem „stillen“ *knock in*. Die korrekte Integration der StopUCN2- Kassette wird mittels Southern Blot überprüft.

Aus ES-Zellen, die den *knock in* im *R26* Locus tragen, wurden mehrere Chimären generiert, aus denen nach Verpaarung mit C57BL/6J Mäusen und Keimbahntransmission des modifizierten *R26* Allels in der F1-Generation Mäuse des Genotyps $R26^{+/\text{stopUCN2}}$ hervorgingen. Diese Mauslinie wird im folgenden als UCN2-OE bezeichnet. Homozygote $R26^{\text{stopUCN2}/\text{stopUCN2}}$ Mäuse wurden aus der Verpaarung von heterozygoten Tieren der F1-Generation erhalten. Der Genotyp der Tiere wurde mittels PCR und Southern Blot aus der Schwanz-DNA ermittelt (Abb. 8, 9).

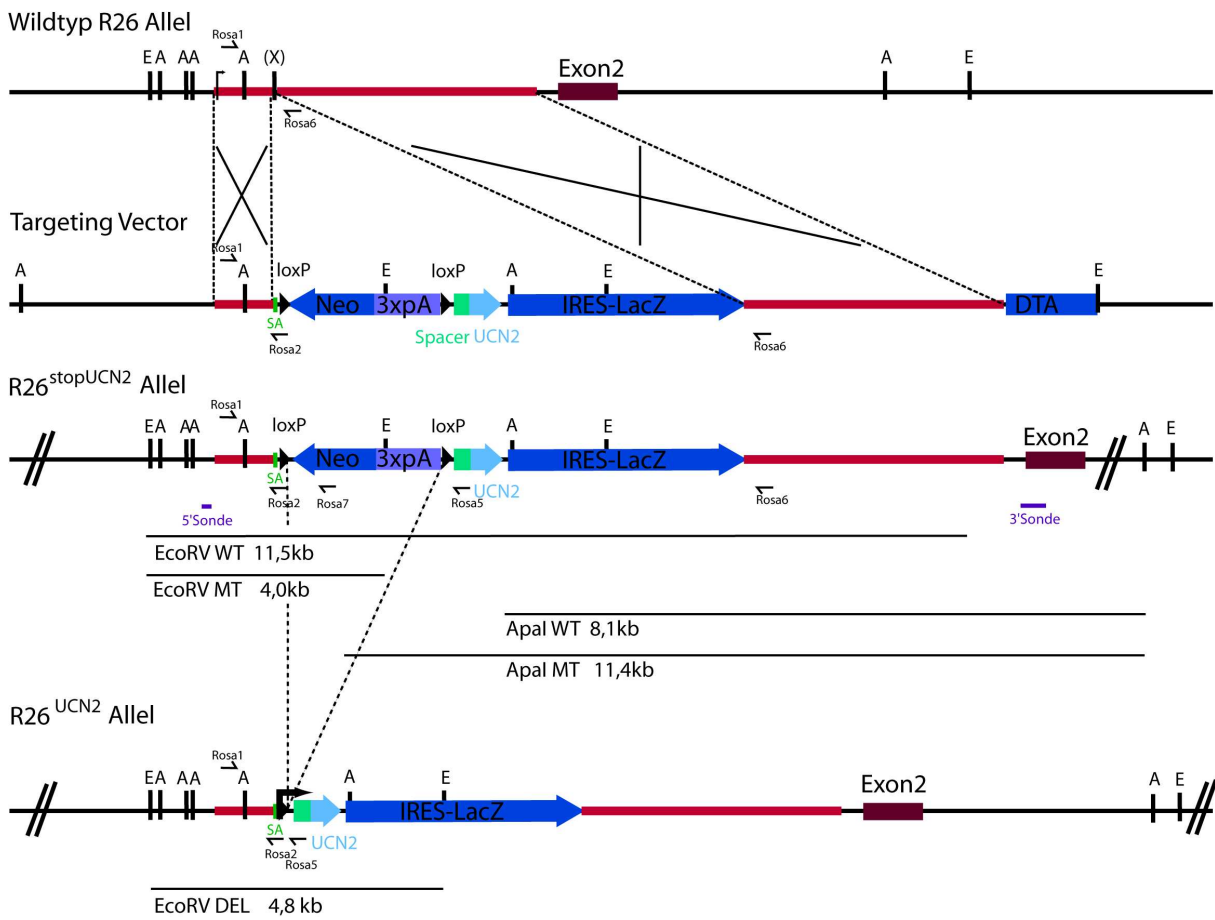


Abb. 8: Targetingstrategie zur Generierung eines konditionalen UCN2 überexprimierenden Alleles. Schematische Darstellung des R26 Wildtyp Locus, des Targeting Vektors, des rekombinierten R26^{stopUCN2} Allels und des aktiven R26^{UCN2} Allels mit relevanten Restriktionsenzymchnittstellen (E:EcoRV; A:ApaI; X:XbaI). Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt mittels einer externen 5'Sonde oder 3'Sonde (WT: Wildtyp DNA-Fragment, M:;DNA-Fragment nach homologer Rekombination, DEL: DNA-Fragment nach Cre-Rekombination). Die Identifikation der verschiedenen Allele geschieht über die PCR Primerkombinationen (Rosa-1, Rosa-2, Rosa-6 und Rosa-1,Rosa-5,Rosa-7).

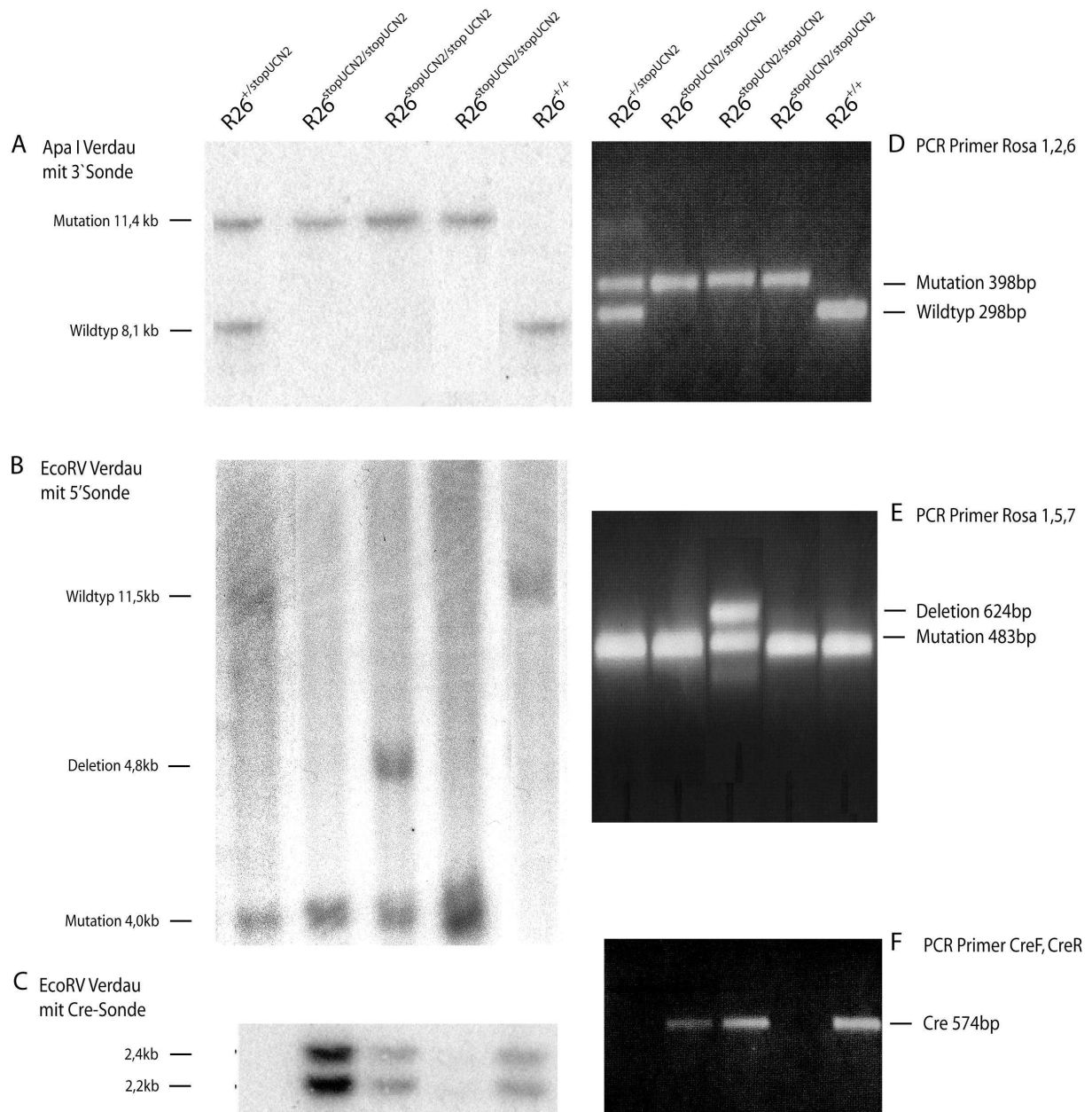


Abb.9: Genotypisierung von UCN2-OE Mäusen mit Hilfe von Southern Blot und PCR.

A) Southern Blot, *ApaI* Verdau mit 3'Sonde hybridisiert. B) Southern Blot, *EcoRV* Verdau mit 5' Sonde hybridisiert. C) Southern Blot *EcoRV* Verdau mit *Cre*- Sonde hybridisiert. D) PCR Produkte der Primer *Rosa-1, Rosa-2, Rosa-6*. E) PCR Produkte der Primern *Rosa-1, Rosa-5, Rosa-7*. F) PCR Produkt der Primer *CreF* und *CreR*

Die R26^{stopUCN2/stopUCN2} Mäuse wurden mit hemizygoten *Nestin-Cre* Tieren verpaart. In der *Nestin-Cre* Mauslinie wird die *Cre*-Rekombinase in neuroglialen Vorläuferzellen unter der Kontrolle des *Nestin* Promotors der Ratte im Zentralen Nervensystems (ZNS), nicht aber in den peripheren Organen der Maus, exprimiert (Tronche et al., 1999). Somit erhält man in der F1-Generation dieser Verpaarung folgende Genotypen: R26^{+/-stopUCN2}*Nestin-Cre* und R26^{+/-stopUCN2}. R26^{+/-stopUCN2}*Nestin-Cre* Tiere exprimieren *UCN2* und *LacZ* heterozygot in

allen Zellen des ZNS. Homozygot UCN2 überexprimierende Mäuse wurden aus der Verpaarung von $R26^{+/stopUCN2}$ *Nestin-Cre* mit $R26^{stopUCN2/stopUCN2}$ erhalten. Aus den Nachkommen dieser Verpaarung wurden folgende Genotypen für weitere Experimente verwendet:

- $R26^{stopUCN2/stopUCN2}$ (**UCN2-OE^{con}**)
Mäuse, die weder UCN2 noch LacZ überexprimieren.
- $R26^{+/stopUCN2}$ *Nestin-Cre* (**UCN2-OE^{het}**),
Mäuse, die heterozygot UCN2 und LacZ im ZNS überexprimieren.
- $R26^{stopUCN2/stopUCN2}$ *Nestin-Cre* (**UCN2-OE^{hom}**),
Mäuse, die homozygot UCN2 und LacZ im ZNS überexprimieren.

Die UCN2 Expression wird nur in den Zellen aktiviert, in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist bzw. zu einem früheren Zeitpunkt aktiv war. Wird die Stoppkassette nicht entfernt, wie das bei $R26^{stopUCN2/stopUCN2}$ Tieren der Fall ist, sind diese mit Wildtypieren gleichzusetzen (Friedrich and Soriano, 1991; Zambrowicz et al., 1997). Wird die Stoppkassette aus dem Genom entfernt, kann UCN2 exogen kontrolliert durch den *R26* Promotor exprimiert werden. Zur Kontrolle der Funktionalität dieses Expressionssystems wurde zunächst die genetische Komponente mit Hilfe genomischer Schwanz-DNA über PCR und Southern Blot überprüft. In diesem Gewebe sollte es nicht zur Rekombination und somit auch nicht zur Entfernung der Stoppkassette gekommen sein. Es kann so festgestellt werden, ob das Tier das modifizierte *R26* Allel trägt, dafür heterozygot oder homozygot ist und ob es zusätzlich die cDNA für die Cre-Rekombinase im Genom enthält. Hat eine Rekombination im Schwanzgewebe stattgefunden, muss davon ausgegangen werden, dass die Cre-Rekombinase frühzeitig, z.B. während der Spermato- oder Oogenese, aktiv gewesen war und die Stoppkassette somit schon im Einzellstadium des Spermiums oder der Eizelle entfernt wurde. Tiere, die aus diesen Zellen entstanden sind, exprimieren UCN2 in jeder Zelle des Gewebes, in der auch *R26* aktiv ist, also ubiquitär. In diesem Fall ergibt die PCR des Primerpaares Rosa-1 und Rosa-5 aus genomischen Schwanz-DNA Proben ein 483bp großes Produkt (siehe Abb. 9). Solche vereinzelt auftretenden Tiere wurden aus den Experimenten ausgeschlossen und für die Züchtung einer neuen Mauslinie verwendet, die UCN2 ubiquitär in der Maus überexprimieren soll.

5.2 Überprüfung des Expressionsmusters

Über LacZ Färbung und *in situ*-Hybridisierung (ISH) mit einer radioaktiv markierten UCN2 „antisense“ Sonde wurde die Expression im ZNS nachgewiesen. Sowohl bei der LacZ Färbung als auch in der ISH ist ein klarer Gendosisseffekt zu erkennen (Abb. 10). Eine ektopische Expression konnte im Herzen, in der Adenohypophyse, der Nebenniere, der Lunge, der Leber sowie im Darm über LacZ Färbung ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

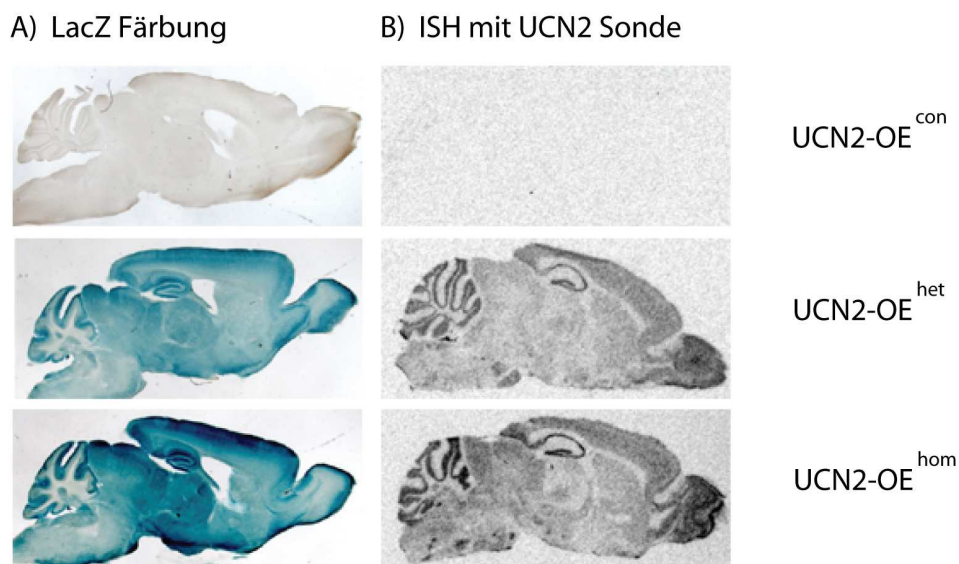


Abb. 10: Nachweis zur Funktionalität des LacZ-Reportersystems und der Überexpression von UCN2 im ZNS A) LacZ-Färbung B) Autoradiographie einer *in situ*-Hybridisierung mit einer UCN2 „antisense“ Sonde.

5.3 Expressionsanalyse CRH-relevanter Gene

Die massive Überexpression eines Gens kann zu Adaptions- oder Kompensationsreaktionen führen, so dass die Expression von Genen ähnlicher Funktion oder Genen innerhalb des gleichen Regelkreises vermindert oder verstärkt wird. In dieser Expressionsstudie wurden für jedes zu untersuchende Gen drei Kontrollhirne mit drei Mutantenhirnen verglichen. Die Expression wurde mit Hilfe des Programms „ScionImage“ von Röntgenfilmen quantifiziert. Die Schwärzung des Films steht im direkten Zusammenhang mit der Anzahl an Sonden, die

an dem Gehirnschnitt gebunden haben und diese wiederum stehen in direktem Zusammenhang mit der Anzahl an RNA, die in der Zelle zur Verfügung steht.

5.3.1 Expression von CRH-R2

Zunächst wurde die Expression des CRH-R2 in den folgenden Regionen quantifiziert: laterales *Septum* (LS), *Plexus Choroideus* (CP), *Bed Nucleus der stria terminalis* (BNST), ventromedialer Hypothalamus (VMH) und dorsaler *Ncl. raphe* (DR) (Abb. 11 und Abb. 12).

In keiner dieser Regionen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Die Expression des CRH-R2 scheint in UCN2-OE^{hom} verglichen mit UCN2-OE^{con} Tieren durch den Überschuss von UCN2 nicht beeinflusst zu werden.

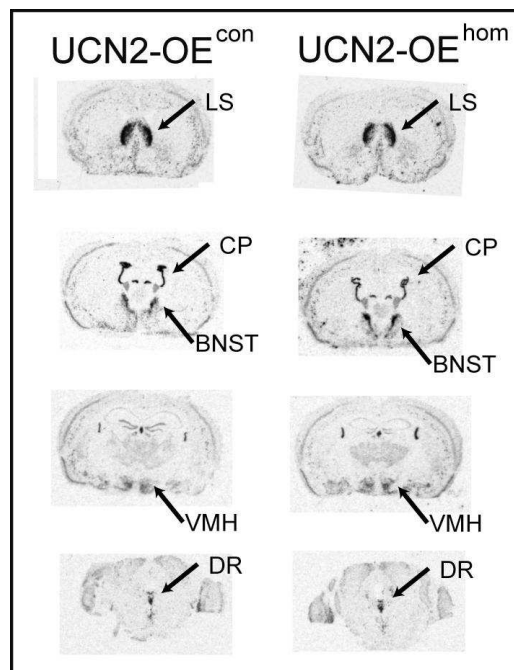


Abb. 11: Repräsentative Abbildung der CRH-R2 Expression in UCN2-OE^{hom} und UCN2-OE^{con} Tieren. Laterales Septum (LS), Plexus Choroideus (CP), Bed Nucleus der stria terminalis (BNST), ventromedialer Hypothalamus (VMH), dorsaler Ncl. raphe (DR)

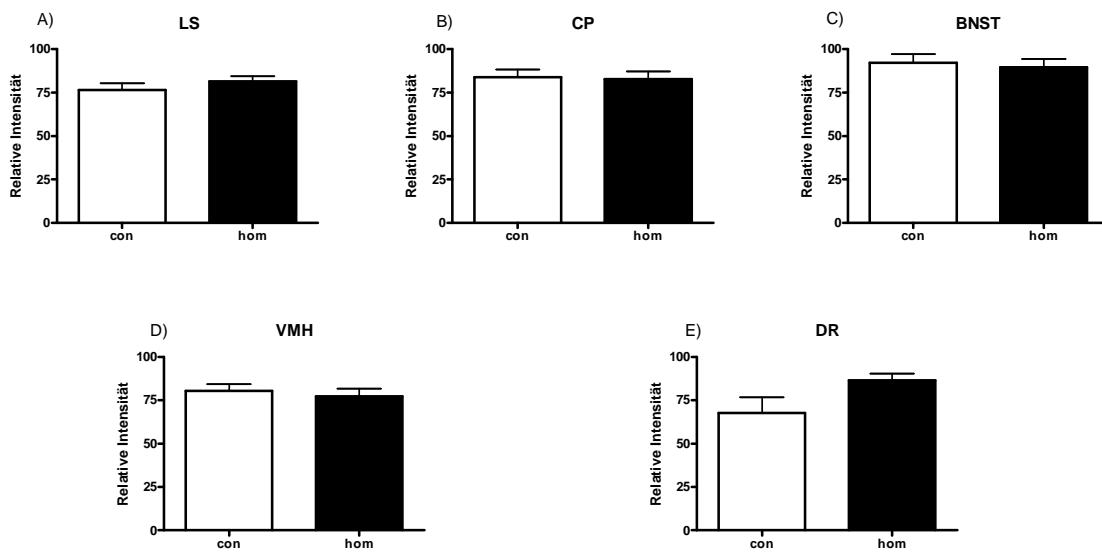


Abb. 12: Relative Expressionsstärke des CRH-R2 in den Regionen A) LS, B) CP, C) BNST, D) VMH und E) DR. Quantifizierung erfolgt mittels „ScionImage“.

5.3.2 Expression des CRH-R1

Bei der Analyse des im Gehirn sehr weit verbreiteten CRH-R1 haben wir uns auf die Regionen basolaterale Amygdala, *Reticular thalamic Nucleus* (RT), die *CA1* Region des Hippocampus und den *Ncl. ruber* beschränkt, da diese leicht einzugrenzen und zu quantifizieren sind.

In der basolateralen Amygdala wurde kein Unterschied in der Expression des CRH-R1 festgestellt. Jedoch konnte sowohl im RT als auch im *Ncl. ruber* eine signifikante Steigerung (1,2-fach bzw. 1,3-fach) der CRH-R1 Expression in UCN2-OE^{hom} Gehirnschnitten verzeichnet werden. In der CA1 Region des Hippocampus hingegen zeigen die Daten, dass die Transkription von CRH-R1 in UCN2-OE^{hom} runterreguliert wurde (0,9-fach) (Abb. 13 und Abb. 14).

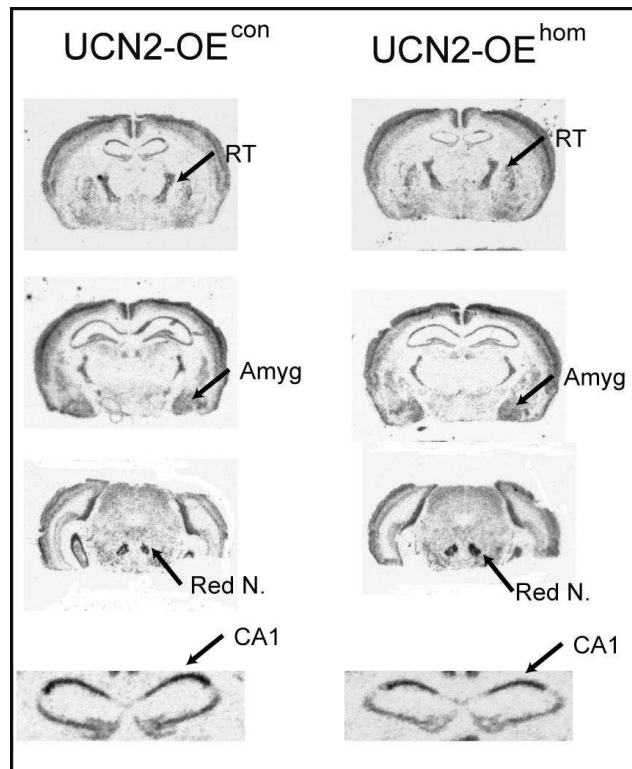


Abb.13: *Repräsentative Abbildung der CRH-R1 Expression in UCN2OE^{hom} und UCN2-OE^{con}. Reticular thalamic Nucleus (RT), Amygdala (Amyg), Ncl. ruber (Red N.), CA1 Region des Hippocampus (CA1).*

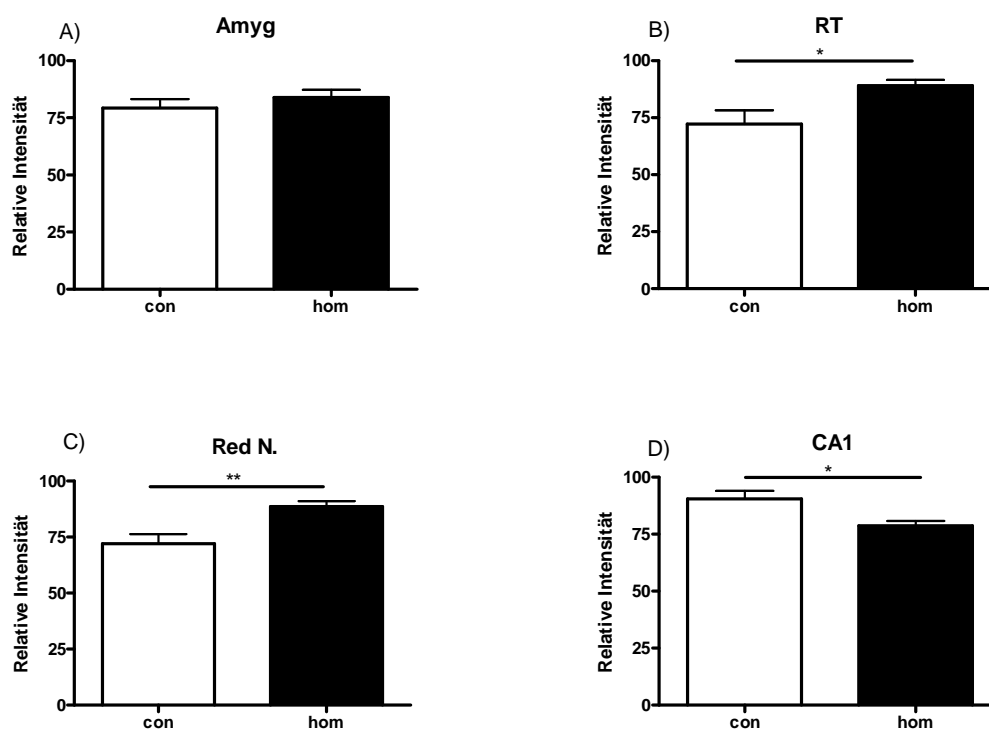


Abb. 14: *Relative Expressionsstärke des CRH-R1 in den Regionen A) Amyg B)RT, C) Red N. und D) CA1. Quantifizierung erfolgte mittels „ScionImage“. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$ (Student t-Test)*

5.3.3 Expression von UCN3

Für die Expressionsanalyse des mit UCN2 eng verwandten UCN3 wurde die mRNA in der *perifornical area* und der medialen Amygdala quantifiziert. In keiner dieser untersuchten Regionen konnte ein Unterschied in der Expression zwischen den verschiedenen Genotypen gefunden werden (Abb. 15 und Abb. 16).

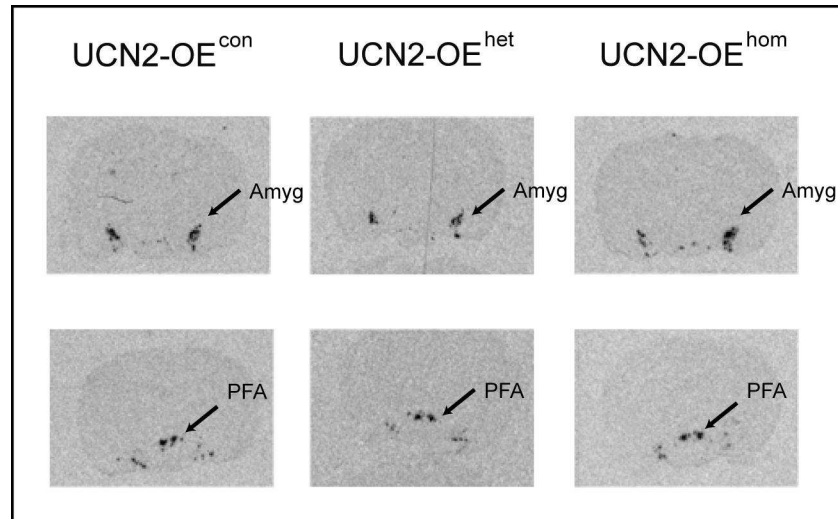


Abb. 15: Repräsentative Abbildung der UCN3 Expression in UCN2-OE^{con}, UCN2-OE^{het} und UCN2-OE^{hom}. Mediale Amygdala (Amyg), perifornical area (PFA).

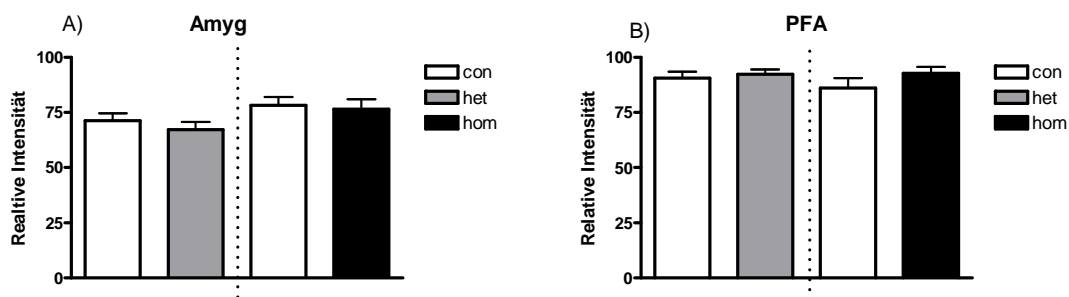


Abb. 16: Relative Expressionsstärke von UCN3 in den Regionen A) Amyg und B) PFA. Quantifizierung erfolgte mittels „ScionImage“.

5.3.4 Expression von CRH

Da im groben Vergleich der Expressionsmuster der verschiedenen Mausmutanten kein offensichtlicher Unterschied in der Expression von CRH zu erkennen war, haben wir uns auf die quantitative Analyse des PVN und LC beschränkt. In diesen Regionen konnten wir

zeigen, dass sich die Expression auch nach Quantifizierung in den UCN2 überexprimierenden Mäusen nicht verändert hat (Abb. 17).

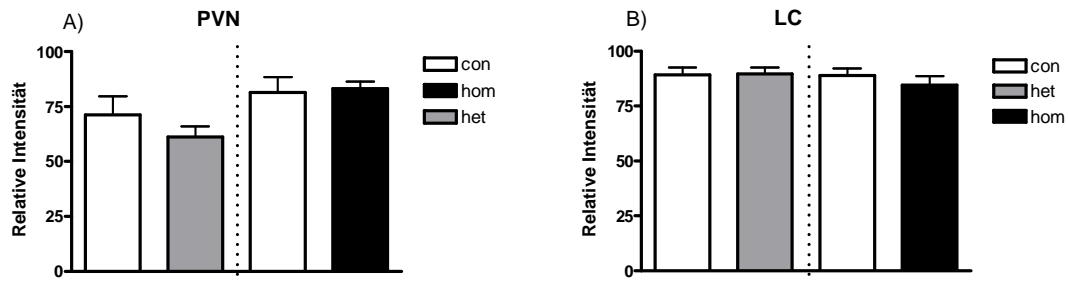


Abb. 17: Relative Expressionsstärke von CRH in den Regionen A) Paraventricular Nucleus (PVN) und B) Locus Cerouleus (LC). Quantifizierung erfolgte mittels „ScionImage“.

5.3.5 Expression von UCN

UCN wird in erster Linie im *Ncl. Edinger Westphal* (EW) exprimiert. Die Analyse von UCN in diesem Kern konnte keinen Unterschied bezüglich der Expression zwischen den Genotypen zeigen (Abb. 18 und Abb. 19).

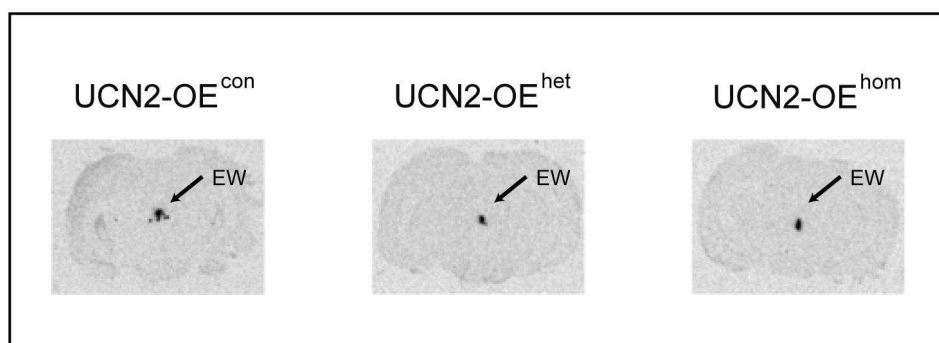


Abb. 18: Repräsentative Abbildung der UCN Expression in UCN2-OE^{con}, UCN2-OE^{het} und UCN2-OE^{hom}. Ncl. Edinger Westphal (EW).

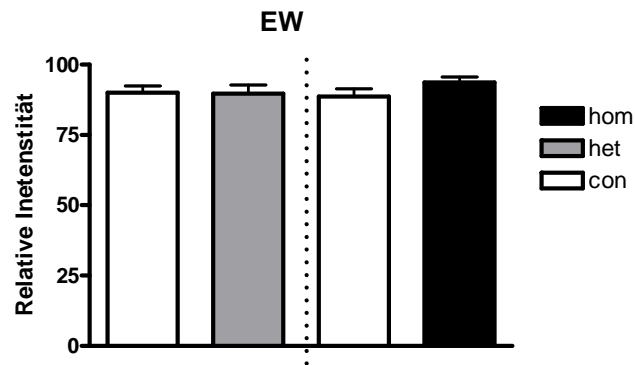


Abb. 19: *Relative Expression von UCN im Ncl. Edinger Westphal (EW). Quantifizierung erfolgte mittels „ScionImage“.*

5.4 Endokrinologische Analyse

Um die Auswirkungen der Überexpression von UCN2 auf die Stressachse zu untersuchen, wurde den Versuchstieren Blut entnommen und mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) die Konzentration von Corticosteron (CORT) und Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) im Plasma bestimmt. Das Blut der Mäuse wurde entweder *retro-orbital* oder nach dem Dekapitieren direkt aus dem Torso abgenommen. Um eine mögliche Tagesrhythmusstörung der Stresshormone in UCN2 überexprimierenden Mäusen auszuschließen, wurde nicht-gestressten Tieren morgens (8:00 Uhr) und abends (17:00 Uhr) Blut entnommen. Die Reaktion der HPA-Achse auf 10-minütigen Immobilisationsstress wurde anhand der CORT- und ACTH-Werte 10 min und 30 min nach dem Stressor ermittelt.

5.4.1 Bestimmung der basalen CORT-Konzentration im Blutplasma

Für die Blutwerte morgens wurden UCN2-OE^{hom} und UCN2-OE^{con} Männchen dekapitiert. Die CORT-Werte für den Abend wurden sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen der Genotypen UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} aus *retro-orbital* gewonnenem Blut ermittelt.

Die RIA-Analyse des Blutplasmas dieser Tiere zeigte, dass sich die CORT-Konzentrationen der verschiedenen Genotypen nicht signifikant unterscheiden. Morgens sind die CORT-Werte niedrig und abends steigen sie unabhängig vom Genotypen an. Die CORT-Werte der Weibchen sind übereinstimmend mit der Literatur (Handa et al., 1994; Laviola et al., 2002) annähernd doppelt so hoch wie die der Männchen (Abb. 20).

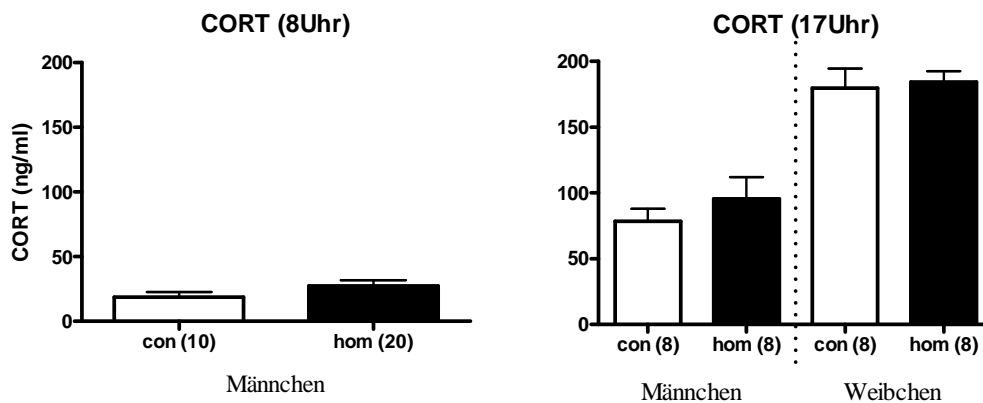


Abb. 20: Bestimmung der CORT Konzentration morgens und abends bei $UCN2-OE^{con}$, $UCN2-OE^{hom}$ Männchen und Weibchen.

5.4.2 Plasma CORT-Konzentration nach Immobilisationsstress

10-minütiger Immobilisationsstress führt bei $UCN2-OE^{hom}$, im Vergleich zu $UCN2-OE^{con}$ Männchen, zu einem signifikant niedrigeren Anstieg (0,8-fach) der CORT-Konzentration im Blutplasma. 30 min nach dem Stressor ist kein Unterschied zwischen den Genotypen $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ feststellbar und dies weder bei den Männchen noch bei den Weibchen. Der geschlechtsspezifisch erhöhte CORT-Wert der Weibchen bleibt jedoch auch 30 min nach dem Stressor unabhängig vom Genotypen erhalten (Abb. 21).

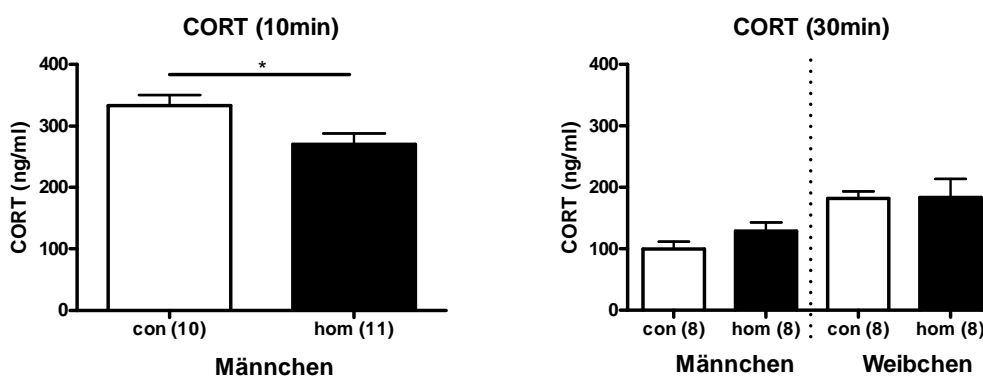


Abb. 21: Bestimmung der CORT-Konzentration 10 bzw. 30 min nach 10-minütigem Immobilisationsstress von $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Männchen und Weibchen. *: $p < 0,05$; (Student t-Test)

5.4.3 Bestimmung der ACTH-Konzentration im Blutplasma

Die ACTH-Konzentration im Blutplasma gibt Aufschluss über die Reaktivität der HPA-Achse. Im nicht-gestressten Zustand zeigen männliche UCN2-OE^{hom} Mäuse im Vergleich zu UCN2-OE^{con} morgens keine Veränderungen im ACTH-Spiegel. 30 min nach einem 10-minütigen Immobilisationsstress zeigen UCN2 überexprimierende Männchen einen 1,5-fach erhöhten ACTH-Wert im Vergleich zu den Kontrollmännchen.

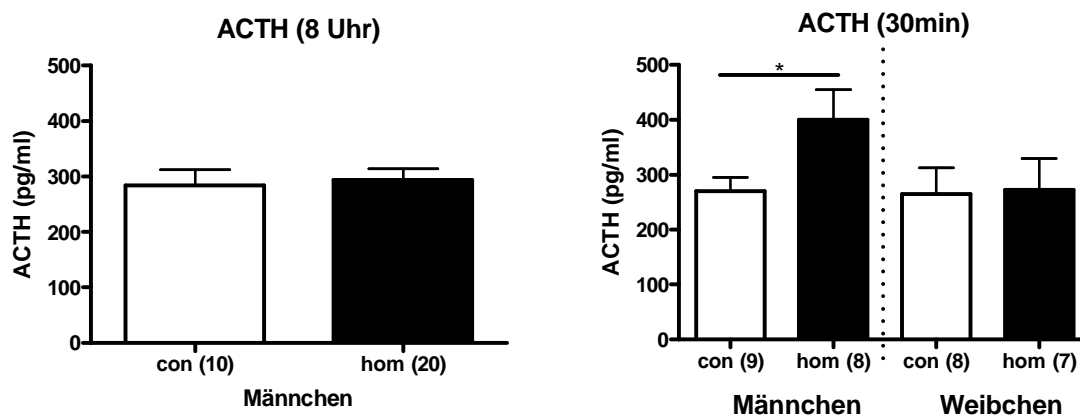


Abb.22: Bestimmung der ACTH-Konzentration im Plasma morgens und 30 min nach 10-minütigem Immobilisationsstress von UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Männchen und Weibchen. *: $p < 0,05$; (Student *t*-Test).

5.5 Verhaltensstudien an UCN2 überexprimierenden Mäusen

Standardisierte Verhaltenstests können veränderte Reaktionen von Mäusen auf verschiedene Stressoren und unbekannte Situationen aufklären. Wie schon in der Einleitung beschrieben, beeinflusst UCN2 i.c.v. oder i.p. verabreicht die Lokomotion, ängstliches Verhalten und erlernte Hilflosigkeit. In welchem Maße eine dauerhafte Überexpression des CRH-R2 Agonisten UCN2 das Verhalten von Mäusen verändert, soll in vier verschiedenen Verhaltenstests untersucht werden.

5.5.1 Dark/Light Box Test

In diesem Test wird die angeborene Neugier der angeborenen Ängstlichkeit der Maus gegenübergestellt. Mäuse halten sich lieber in dunklen geschützten Arealen auf, aber sie wollen auch ihre Umgebung erforschen und begeben sich so auf unbekanntes vielleicht auch

„angsteinflößendes“ Territorium. Dieser Umstand wird in der *Dark/Light Box* ausgenutzt. Man bietet den Mäusen ein dunkles „sicheres“ Kompartiment und ein helles eher aversives Kompartiment in einer Box an. Über die Zeit, die sich die Maus im hellen im Vergleich zum dunklen Teil der Box aufhält und über die Latenz des ersten Eintritts in den hellen, aversiven Teil, kann man abschätzen, ob die Maus eher „ängstlich“ oder „mutig“ ist.

Während des aktiven Explorationsverhaltens richtet sich die Maus auf den Hinterbeinen auf (*Rearing*). Auch dieses Verhalten kann in dem Versuchsaufbau in die Analyse mit einbezogen werden und gibt einen Anhaltspunkt über die Aufmerksamkeit und Erregtheit der Maus.

Dieser Test wurde zunächst mit 10 bis 11 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen bei 700 Lux im hellen Kompartiment durchgeführt und später bei 300 Lux im hellen Kompartiment mit 3 bis 5 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen wiederholt.

In dem Verhaltensversuch mit 10 bis 11 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen war zu erkennen, dass UCN2-OE^{hom} Männchen tendenziell schneller in das helle Kompartiment (700 lx) eintreten als UCN2-OE^{con} Männchen. Die Aufenthaltsdauer und die zurückgelegte Wegstrecke im hellen Teil der Box war bei UCN2-OE^{hom} Tieren jedoch nicht erhöht. Zwischen den beiden Gruppen ließ sich auch kein Unterschied in der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke und der eingelegten Ruhephasen während der Versuchsdauer feststellen. Auch das *Rearing*-Verhalten differierte nicht wesentlich zwischen den UCN2-OE^{hom} und den UCN2-OE^{con} Tieren (Abb. 23). Auffallend bei diesem Versuchsaufbau war jedoch, dass sich UCN2 überexprimierende und Kontroll-Tiere mehr als 50% der Zeit im dunklen Teil der Box aufgehalten haben. Daher wurde für den Versuchsaufbau für die jüngeren Mäuse die Luxzahl im hellen Teil der Box auf 300 lx reduziert. Dieser Umstand führte jedoch nicht dazu, dass die Mäuse sich nun vermehrt im hellen Teil der Box aufhielten. Diese Mäuse hatten sogar eine noch höhere Aufenthaltsdauer im dunklen Kompartiment. In den anderen getesteten Parametern Latenz des ersten Eintritts in den hellen Teil, zurückgelegte Wegstrecke, Ruhephasen und *Rearings* konnte auch bei den 3 bis 5 Monate alten Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb. 24).

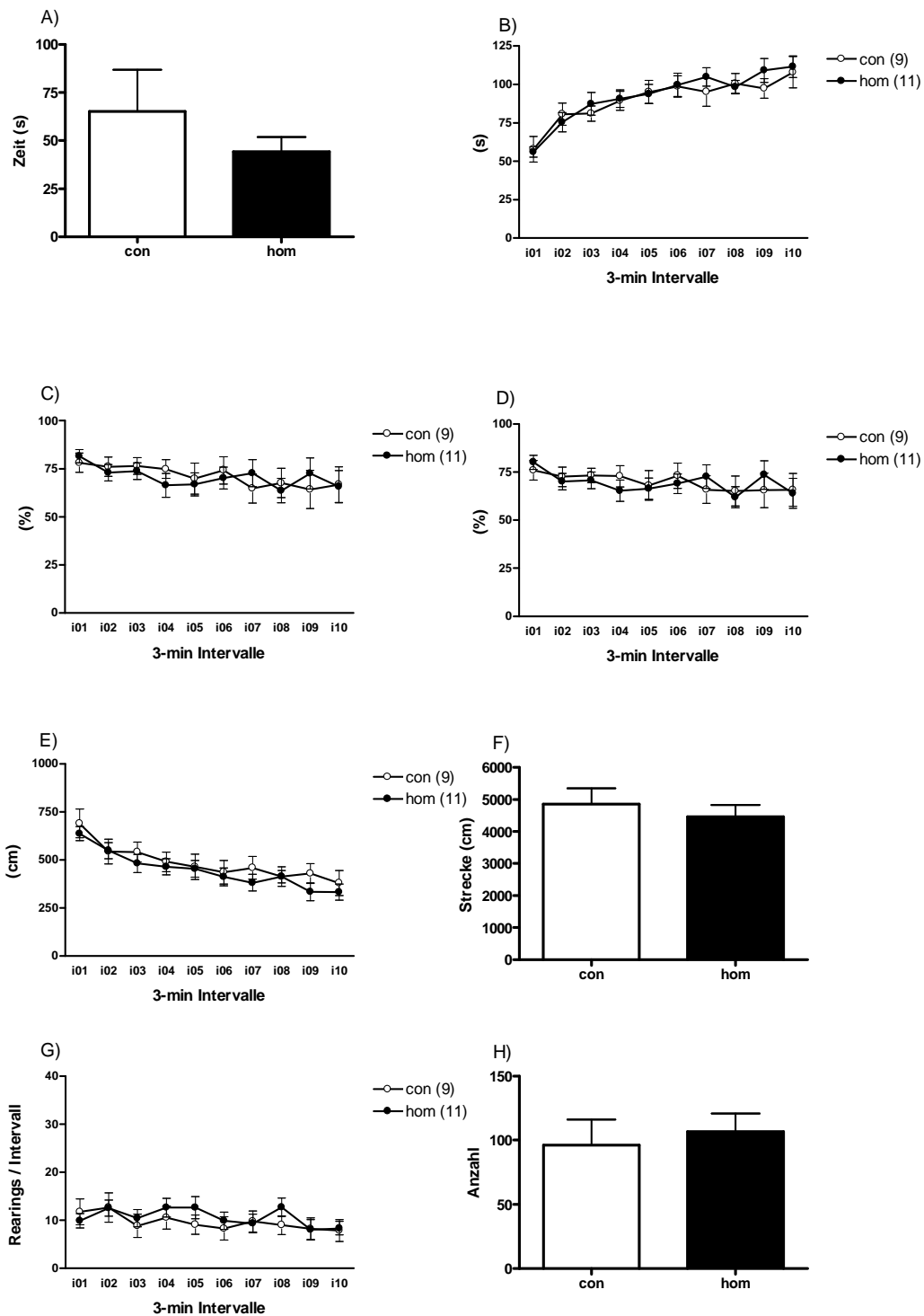


Abb. 23: Graphische Darstellung der Auswertung der Dark/Light Box (700 lx) Ergebnisse bei 10 bis 11 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Tieren.

A) Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in den erleuchteten Teil der Box. B) Länge der Ruhephasen in 3-Minuten Intervallen. C) Aufenthaltsdauer im dunklen Kompartiment prozentual zur Gesamtzeit pro Intervall. D) Zurückgelegte Strecke im dunklen Kompartiment prozentual zur Gesamtstrecke pro Intervall. E) Zurückgelegte Strecke insgesamt pro Intervall. F) Insgesamt zurückgelegte Strecke während des Experiments. G) Anzahl der Rearings pro 3-Minuten Intervall. H) Anzahl der Rearings insgesamt.

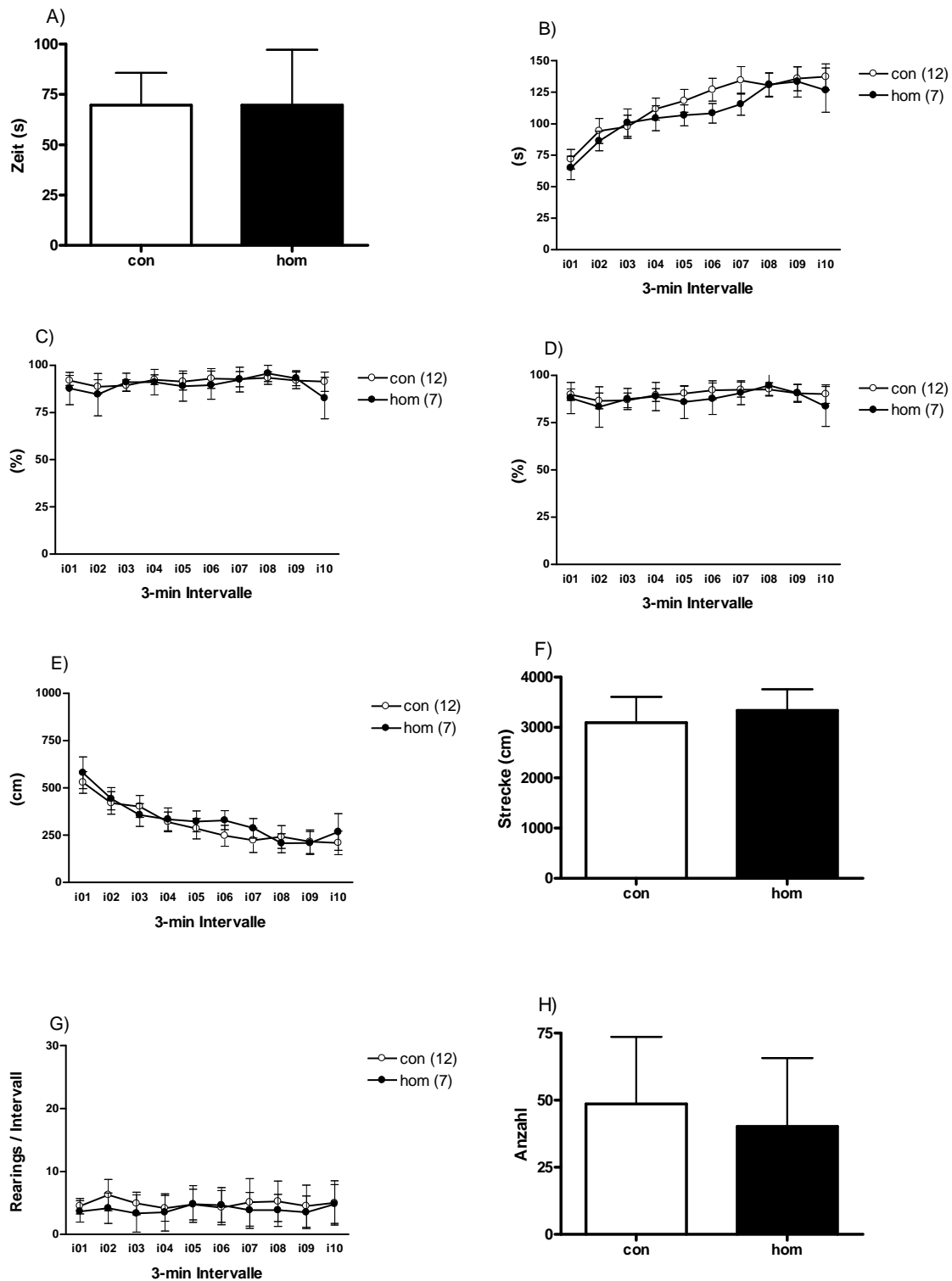


Abb. 24: Graphische Darstellung der Auswertung der Dark/Light Box (300 lx) Ergebnisse bei 3 bis 5 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Tieren.

A) Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in den erleuchteten Teil der Box. B) Länge der Ruhephasen in 3-Minuten Intervallen. C) Aufenthaltsdauer im dunklen Kompartiment prozentual zur Gesamtzeit pro Intervall. D) Zurückgelegte Strecke im dunklen Kompartiment prozentual zur Gesamtstrecke pro Intervall. E) Zurückgelegte Strecke insgesamt pro Intervall. F) Insgesamt zurückgelegte Strecke während des Experiments. G) Anzahl der Rearings pro 3-Minuten Intervall. H) Anzahl der Rearings insgesamt.

5.5.2 *Open field* Test

Im *Open field* Test wird die Maus in eine Box gesetzt und ihr Explorationsverhalten beobachtet. Mit Hilfe dieses Tests kann man die Bewegung im Raum und die Ruhephasen der Maus beobachten und somit besser einschätzen, ob die Maus ein generelles Defizit in der Aktivität bzw. motorischen Beweglichkeit oder ein eingeschränktes Interesse an der Umgebung hat. Ein weiterer Parameter, der in diesen Test einbezogen wird, sind die *Rearings*, das Aufrichten der Maus.

Im ersten Experiment mit 10 bis 11 Monate alten Mäusen zeigten die UCN2 überexprimierenden Mäuse eine Tendenz zu höherer Aktivität, indem sie längere Wegstrecken pro Zeitintervall zurücklegten und eine gesteigerte Aufmerksamkeit, ersichtlich durch vermehrtes *Rearing*, zeigten (Abb. 25). Wir konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf die Ruhephasen der Maus im *Open field* Test feststellen.

In der Wiederholung dieses Experiments wurden die Tiere an vier aufeinander folgenden Tagen dem Test ausgesetzt, um die Unterschiede, die man im ersten Versuch gesehen hatte, zu verdeutlichen. Somit konnte untersucht werden, ob sich die Mutanten anders an die Umgebung adaptieren als Wildtypmäuse. Außerdem wurde die Intervallzahl erniedrigt, so dass ein Experiment nur noch fünf statt zehn 3-Minuten Intervalle hat. Bei diesem neuen Versuch mit 3 bis 5 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen konnte gezeigt werden, dass UCN2-OE^{hom} viel aktiver sind als UCN2-OE^{con} Mäuse. UCN2-OE^{hom} Mäuse legen am ersten, zweiten und vierten Tag des Experiments signifikant mehr Wegstrecke zurück als UCN2-OE^{con} Mäuse. Außerdem haben sie tendenziell weniger Ruhephasen und führen mehr *Rearings* durch als ihre Kontrollgeschwister (Abb. 26).

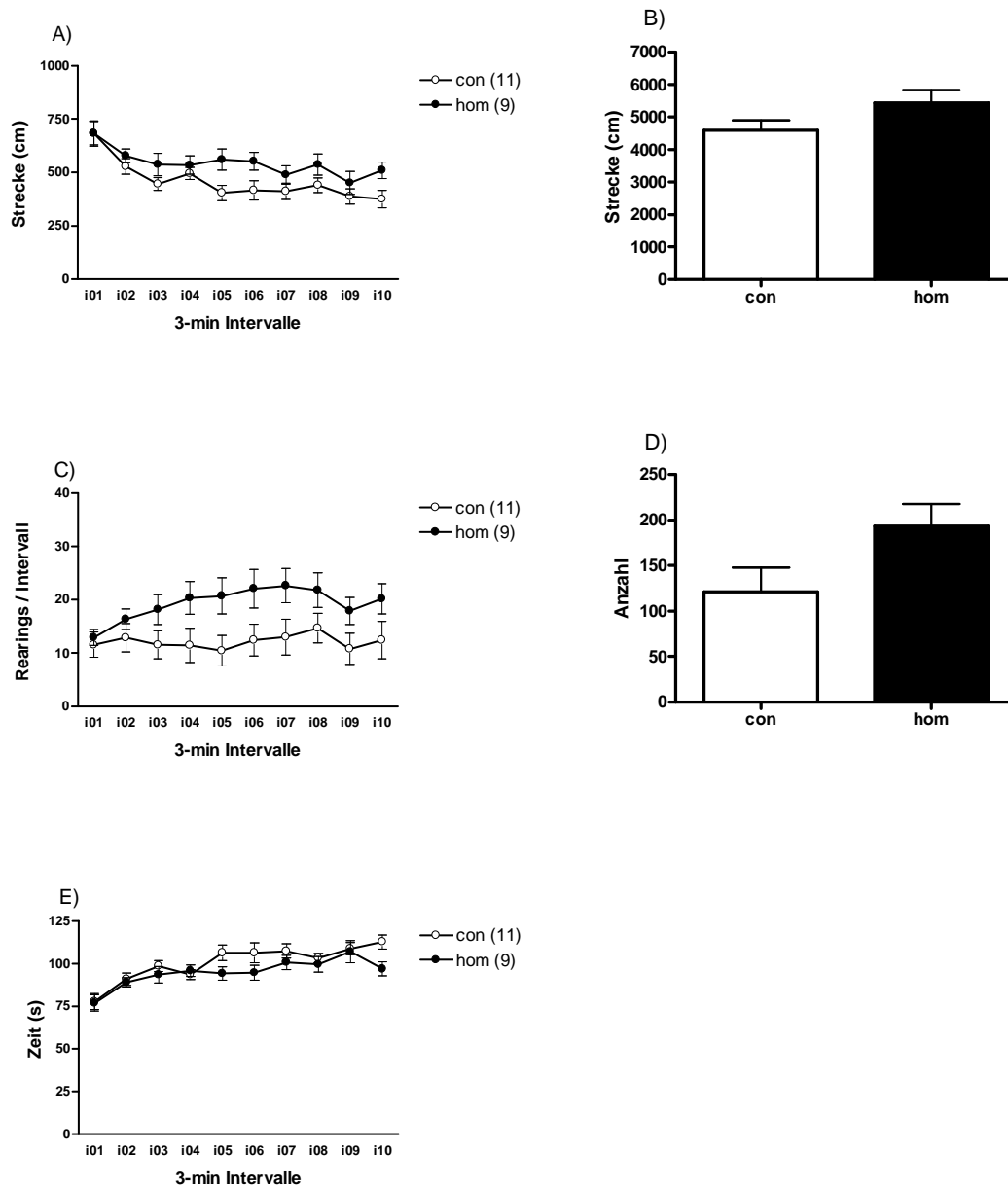


Abb. 25: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Open field Tests bei 10 bis 11 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Mäusen.

A) Zurückgelegte Wegstrecke pro Intervall. B) Insgesamt zurückgelegte Strecke. C) Anzahl der Rearings innerhalb eines Intervalls. D) Anzahl der Rearings insgesamt. E) Dauer der Ruhephasen während eines 3-Minuten Intervalls.

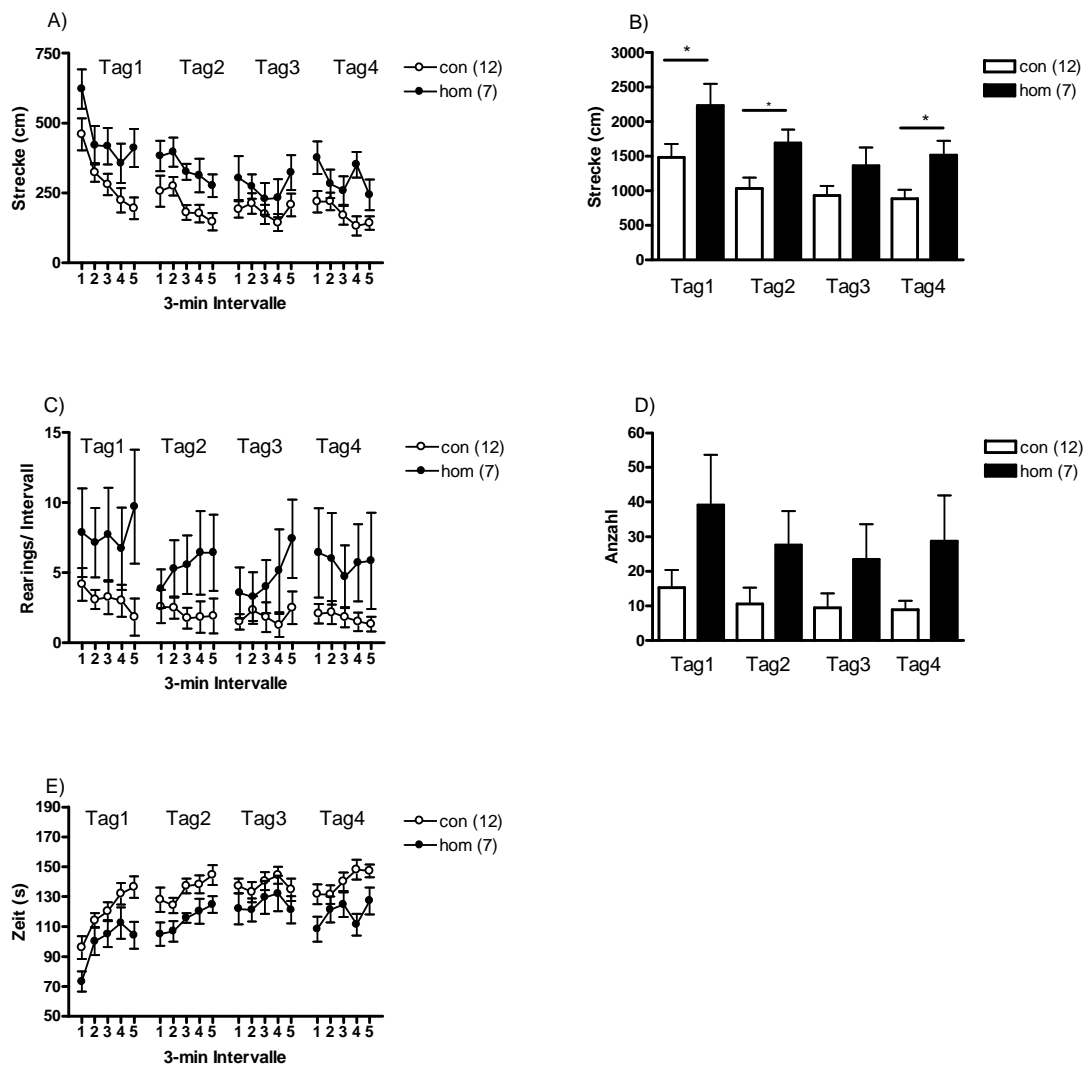


Abb. 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Open field Tests bei 3 bis 5 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Mäusen an vier aufeinander folgenden Tagen.

A) Zurückgelegte Wegstrecke pro Intervall. B) Insgesamt zurückgelegte Strecke. C) Anzahl der Rearings innerhalb eines Intervalls. D) Anzahl der Rearings insgesamt. E) Dauer der Ruhephasen während eines 3-Minuten Intervalls. *: $p < 0,05$; (Student t-Test).

5.5.3 Forced Swim Test

Der *Forced Swim Test* (FST) bzw. Porsolt Test, ist wahrscheinlich der am häufigsten verwendete Test, um depressionsähnliches Verhalten bei Tieren zu untersuchen. (Cryan 2002, Porsolt 2000, Seong 2002). In diesem Test werden die Versuchstiere in einen Zylinder gesetzt, der mindestens 15 cm hoch mit 24-26°C warmem Wasser gefüllt ist, so dass die Tiere den Boden nicht mehr berühren können. Die Tiere sind somit gezwungen zu schwimmen und zu strampeln (*struggling*) oder sich an der Wasseroberfläche treiben zu lassen (*floating*). Ein frühes Aufgeben der Schwimm- oder Strampeltätigkeit wird einem eher depressiven

Verhalten zugeschrieben. Das Tier ergibt sich sozusagen seinem Schicksal und lässt sich treiben. Dieser Effekt kann durch akute Gabe von Antidepressiva umgekehrt werden. Daher scheint der FST ein gutes Model für depressives Verhalten zu sein.

In unserem Versuch wurden sowohl die 10 bis 11 als auch die 3 bis 5 Monate alten Mäuse an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils sechs Minuten lang dem FST ausgesetzt. Bei den älteren Mäusen sieht man am ersten und noch viel stärker am zweiten Tag, dass sich UCN2 überexprimierende Mäuse im Wasser aktiver verhalten als die Kontrolltiere. Die älteren UCN2-OE^{hom} Mäuse *floaten* am zweiten Tag signifikant weniger als die UCN2-OE^{con} Mäuse ($F_{(1,18)}=7,1$, $p<0,05$). Dafür *struggeln* die älteren überexprimierenden Tiere am zweiten Tag signifikant mehr ($F_{(1,18)}=5,3$, $p<0,05$) (Abb. 27).

Bei den 3 bis 5 Monate alten Tieren konnten diese Effekte leider nicht gezeigt werden. Jüngere UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäuse zeigten keinen Unterschied in der Dauer des *Floatens* oder des *Struggelns* (Abb. 28).

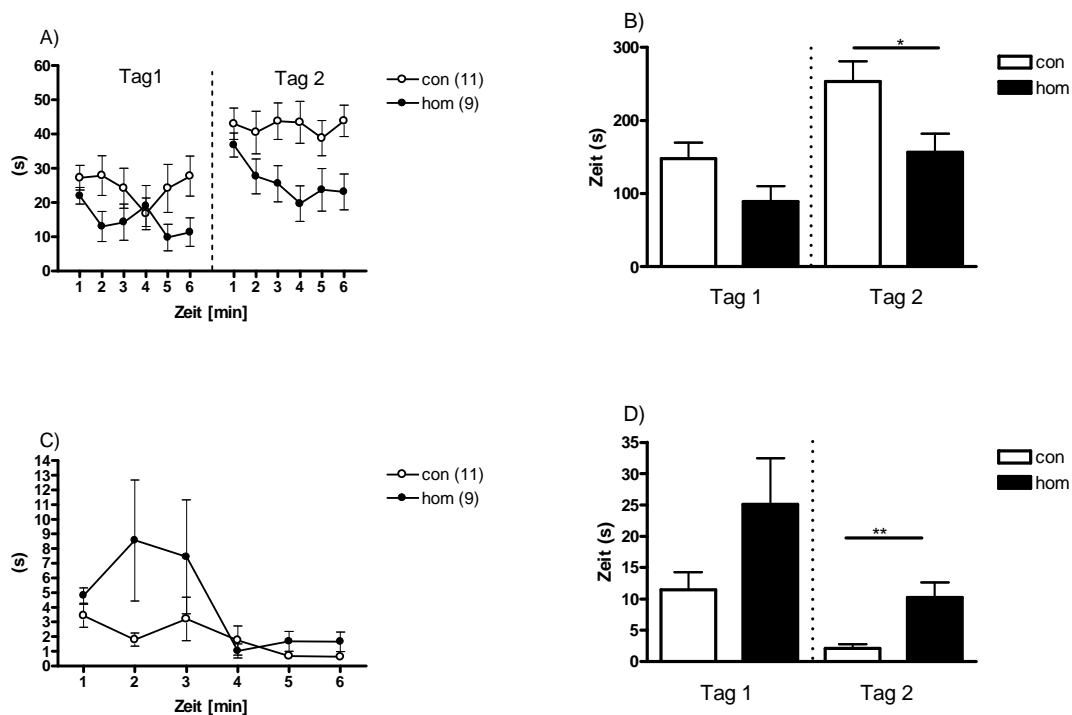


Abb. 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Forced Swim Test bei 10 bis 11 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen.

A) Dauer des *Floatens* während eines Intervalls am ersten und am zweiten Versuchstag. B) Gesamtzeit des *Floatens* am ersten und am zweiten Versuchstag. C) Dauer des *Struggelns* innerhalb eines Intervalls am ersten Versuchstag. D) Gesamtdauer des *Struggelns* am ersten und am zweiten Versuchstag. *: $p<0,05$; (Student t-Test).

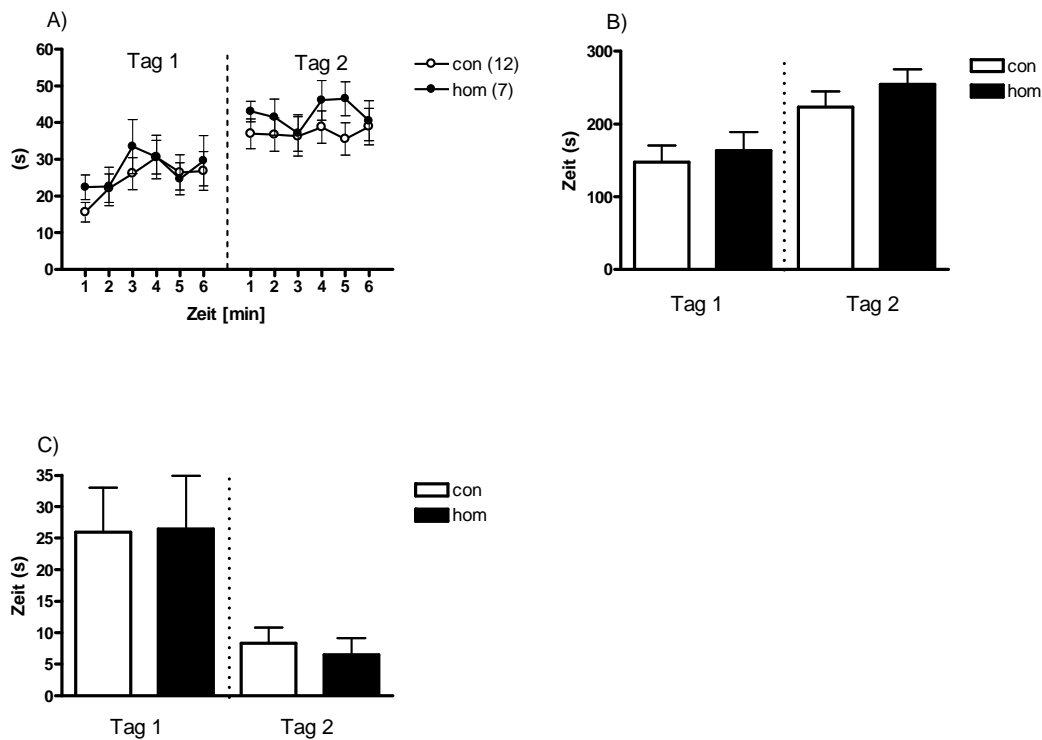


Abb. 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus dem Forced Swim Test bei 3 bis 5 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Mäusen.

A) Dauer des Floatens während eines Intervalls am ersten und am zweiten Versuchstag. B) Gesamtzeit des Floatens am ersten und am zweiten Versuchstag. C) Gesamtdauer des Struggelns am ersten und am zweiten Versuchstag.

5.5.4 Tail Suspension Test

Der *Tail Suspension Test* (TST) untersucht ein ähnliches Verhalten wie der FST. Die Versuchstiere werden an ihrem Schwanz mit einem Klebeband an einem horizontalen Brett befestigt, so dass sie mit dem Kopf nach unten hängen. Die Tiere versuchen sofort aktiv der unangenehmen Situation zu entkommen bis sie schließlich aufgeben und sich der misslichen Lage einfach ausliefern (Steru 1985). Es wird die Zeit gemessen in der das Tier immobil ist, im Gegensatz zu der Zeit in der es versucht, sich aktiv zu befreien. Auch dieser Test zeigt starke, aktivierende Effekte bei der Gabe von Antidepressiva.

10 bis 11 und 3 bis 5 Monate alte $UCN2-OE^{hom}$ Mäuse weisen in diesem Test keine signifikanten Mobilitätsunterschiede zu $UCN2-OE^{con}$ Mäusen auf (Abb. 29 und 30). Die älteren $UCN2$ überexprimierenden Tiere zeigen zwar in den ersten Minuten des Tests eine leicht erhöhte Aktivität und somit weniger Immobilität als die Kontrolltiere, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 29).

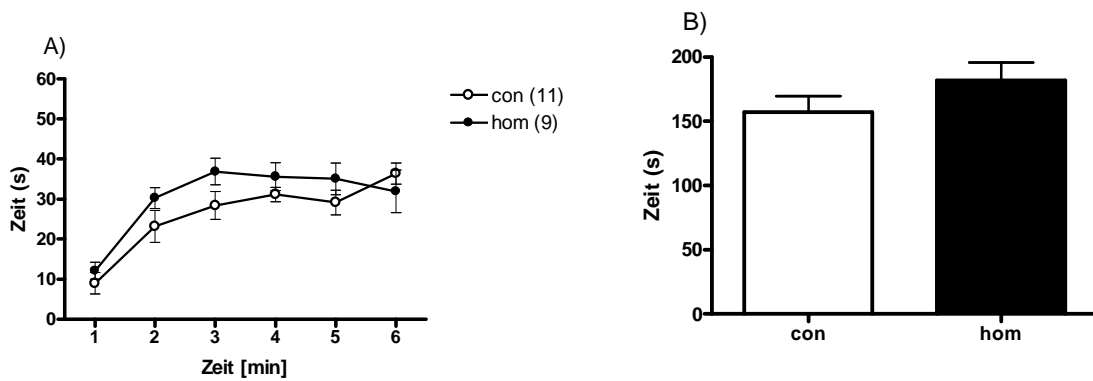


Abb. 29: Graphische Darstellung der Ergebnisse des TST von 10 bis 11 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen.

A) Dauer der Immobilität während eines ein-minütigen Intervalls. B) Gesamtdauer der Immobilität über den ganzen Versuchszeitraum.

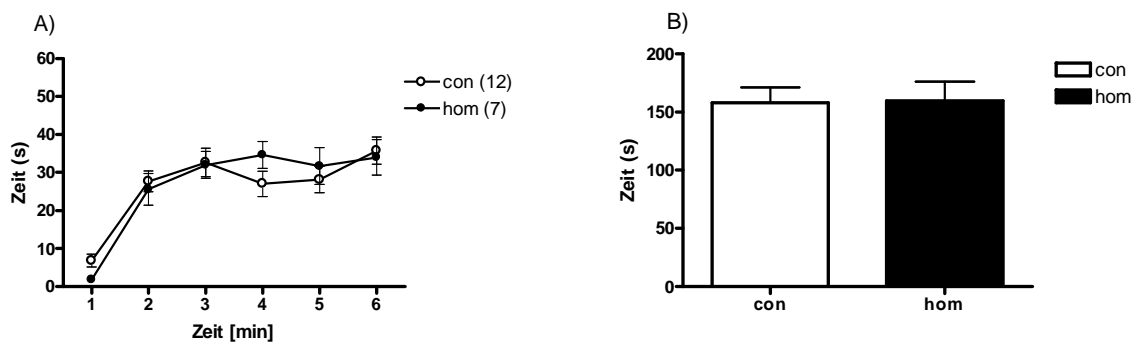


Abb. 30: Graphische Darstellung der Ergebnisse des TST von 3 bis 5 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen.

A) Dauer der Immobilität während eines ein-minütigen Intervalls. B) Gesamtdauer der Immobilität über den ganzen Versuchszeitraum.

5.6 Fressverhalten der UCN2 überexprimierenden Mäuse

Da in vielen in der Literatur beschriebenen Studien, in denen UCN2 i.c.v. injiziert wurde, gezeigt werden konnte, dass UCN2 eine anorektische Wirkung hat, wurde das Fressverhalten der UCN2-OE Mutanten näher beleuchtet.

Es wurden zwei verschiedene Gruppen auf ihr Fressverhalten hin untersucht. Eine Gruppe bestand aus jungen 3 bis 5 Monate alten Männchen und Weibchen, die andere aus 11 bis 12 Monate alten Männchen.

In beiden Gruppen wurde Futter *ad libitum* verabreicht und die gefressene Menge einmal täglich bzw. zweimal täglich eine Woche lang gemessen. Zudem wurde jedes Tier am Anfang und am Ende des Experiments gewogen.

5.6.1 Futtergabe *ad libitum*

In der Gruppe der jungen Tiere konnte kein Gewichtsunterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden, lediglich ein geschlechtsspezifischer Unterschied war zu verzeichnen (Abb. 31).

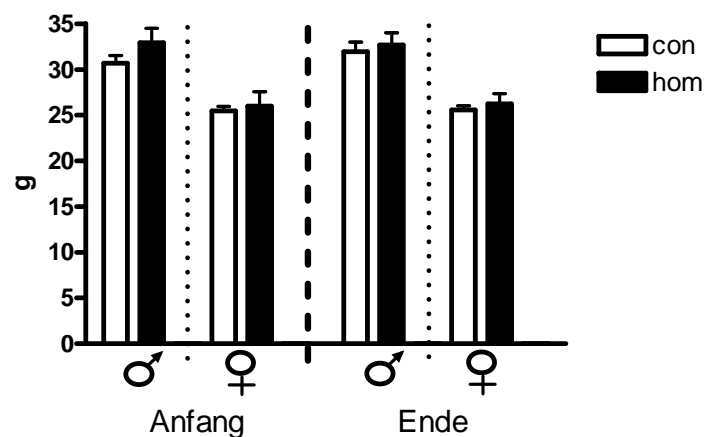


Abb. 31: Körpergewicht von 3 bis 5 Monate alten Männchen und Weibchen, der verschiedenen Genotypen am Anfang und am Ende des Versuchszeitraums.

Bei der Futteraufnahme *ad libitum* konnten wir feststellen, dass Weibchen wesentlich mehr Futter pro Körpergewicht zu sich nehmen als Männchen und dies unabhängig von ihrem Genotyp. Zwischen den Genotypen ist bei den Männchen ein signifikanter Unterschied in der Menge der kumulativen Futteraufnahme über den ganzen Versuchszeitraum zu beobachten ($F_{(1,14)} = 4,7$, $p < 0,05$). Homozygot UCN2 überexprimierende Männchen fressen weniger Futter pro Körpergewicht als ihre Kontrollgeschwister. Bei den Weibchen konnte eine Tendenz zu vermehrter Futteraufnahme bei UCN2-OE^{hom} im Gegensatz zu den UCN2-OE^{con} Weibchen beim Wert 24 Stunden nach der Futteraufnahme pro Körpergewicht festgestellt werden. Bei einem Beobachtungszeitraum über 48 Stunden minimiert sich dieser Effekt (Abb. 32).

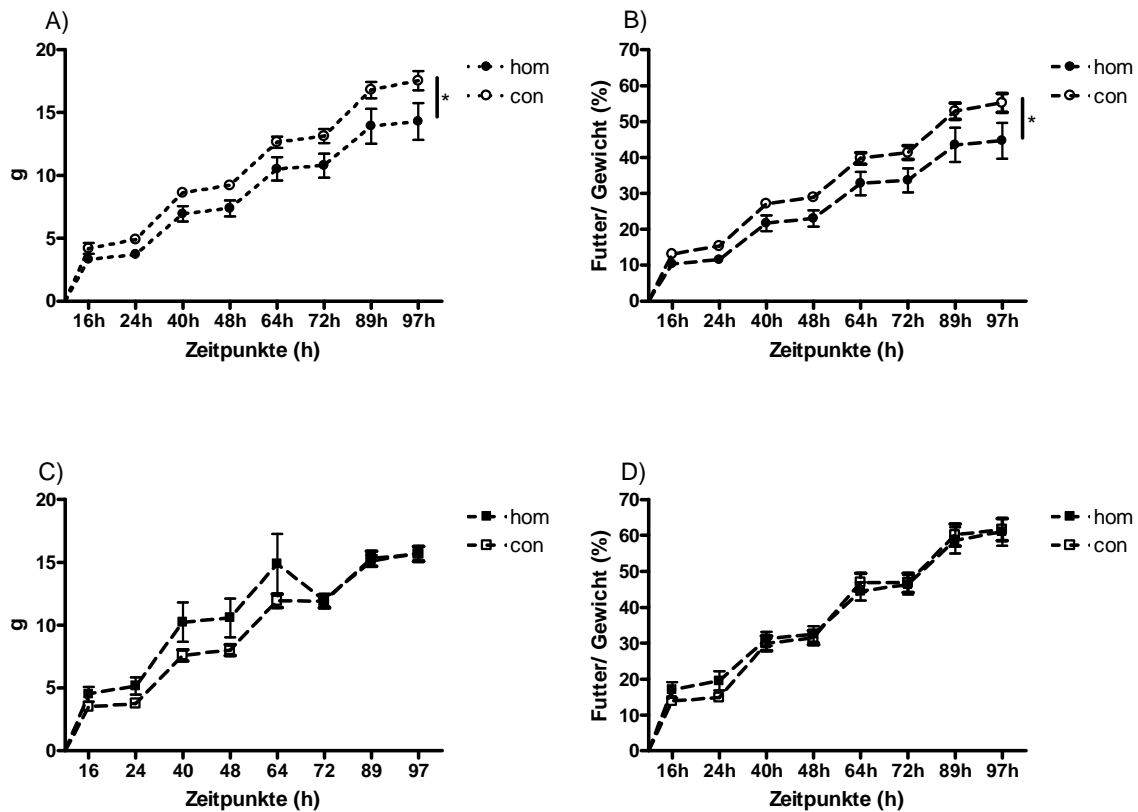


Abb. 32: Ergebnisse aus den ad libitum Fressexperimenten von 3 bis 5 Monate alten Tieren
 Kumulativ gemessene Futtermenge zu den angegebenen Zeitpunkten der A) Männchen und C) Weibchen und gefressene Futtermenge relativ zum Körpergewicht des B) Männchens und D) Weibchens *: $p < 0,05$ (2way ANOVA).

In der Gruppe der älteren Mäuse (11 bis 12 Monate) kann man einen deutlichen Gewichtsunterschied erkennen. UCN2-OE^{hom} Männchen wiegen signifikant weniger als UCN2-OE^{con} Männchen (Abb. 33).

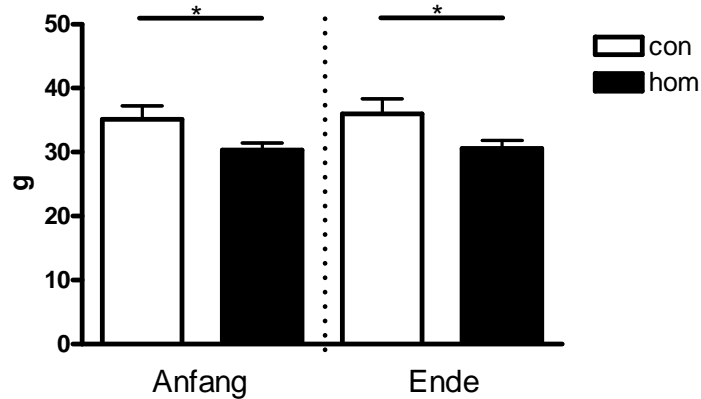


Abb. 33: Körpergewicht der 11 bis 12 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Männchen am Anfang und am Ende des Versuchszeitraum. *: $p < 0,05$ (Student t-Test)

Während der Beobachtung der Futtermenge innerhalb einer Woche konnten wir feststellen, dass ältere UCN2 überexprimierende Mäuse ab dem vierten Tag signifikant mehr Futter pro Körpergewicht zu sich genommen haben als die Kontrolltiere im selben Zeitraum (Abb. 34).

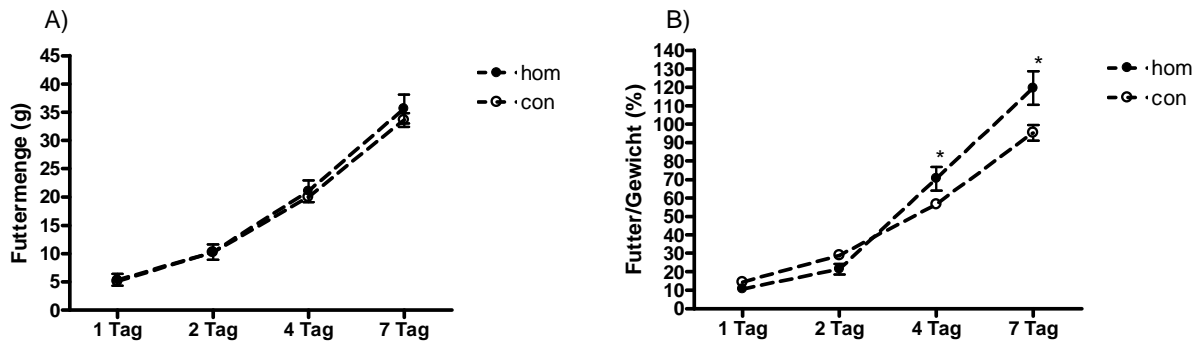


Abb. 34: Ergebnisse aus ad libitum Futterexperiment bei 11 bis 12 Monate alten männlichen Tieren
 A) kumulative Futtermenge und B) kumulative Futtermenge relativ zum Körpergewicht der Maus. *: $p < 0,05$ (Student t-Test)

5.6.2 Futterentzug

Manche Fressverhaltensphänotypen lassen sich erst aufdecken, wenn das Futterangebot nur begrenzt vorhanden und dadurch ein gewisser Stress auf die Tiere ausgeübt wird. Daher haben wir den Tieren für 16 Stunden während ihrer aktiven Phase das Futter vorenthalten (17:00 Uhr bis 9:00 Uhr) und erst wieder zu ihrer Ruhephase angeboten. Danach wurde die Futtermenge und die Gewichtszunahme in verschiedenen Zeitabständen gemessen.

In jeder Gruppe der jungen Tiere verlieren Weibchen und Männchen durch den Futterentzug ca. 2-2,5 g ihres Anfangskörpergewichts, das sind ca. 10% ihres Eigengewichts. Weibchen legen nach 24 Stunden erneuter Futtergabe mehr an Gewicht zu als Männchen. Zwischen den Genotypen besteht allerdings kein Unterschied (Abb. 35). Nach dem Futterentzug ist die Futtermenge bei den Kontrolltieren und den UCN2 überexprimierenden ähnlich. Der im *ad libitum* Versuch festgestellte signifikante Unterschied in der Menge der Futtermenge zwischen UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Männchen wurde durch den Futterentzug aufgehoben. Während der 24 Stunden Futtermenge nach Entzug konnte lediglich eine Tendenz festgestellt werden, dass UCN2 überexprimierende Männchen weniger fressen als Kontrolltiere. Bei den Weibchen konnte erneut kein Unterschied im Fressverhalten zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden (Abb. 36).

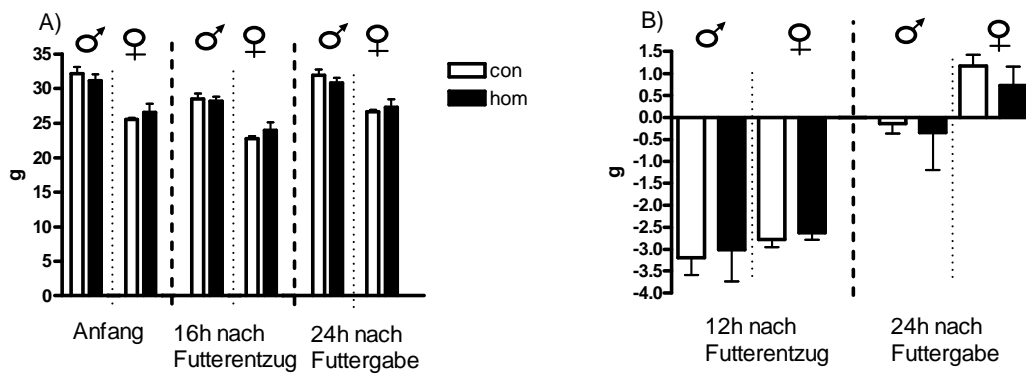


Abb. 35: Körpergewicht der 3 bis 5 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Tieren
 A) Darstellung des Körpergewichts vor, direkt nach 16h Futterentzug und nach 24h erneuter Futtergabe. B) Aus dem Futterentzug resultierender Gewichtsverlust direkt nach dem Futterentzug und nach 24h Erholungsphase bei Männchen (♂) und Weibchen (♀)

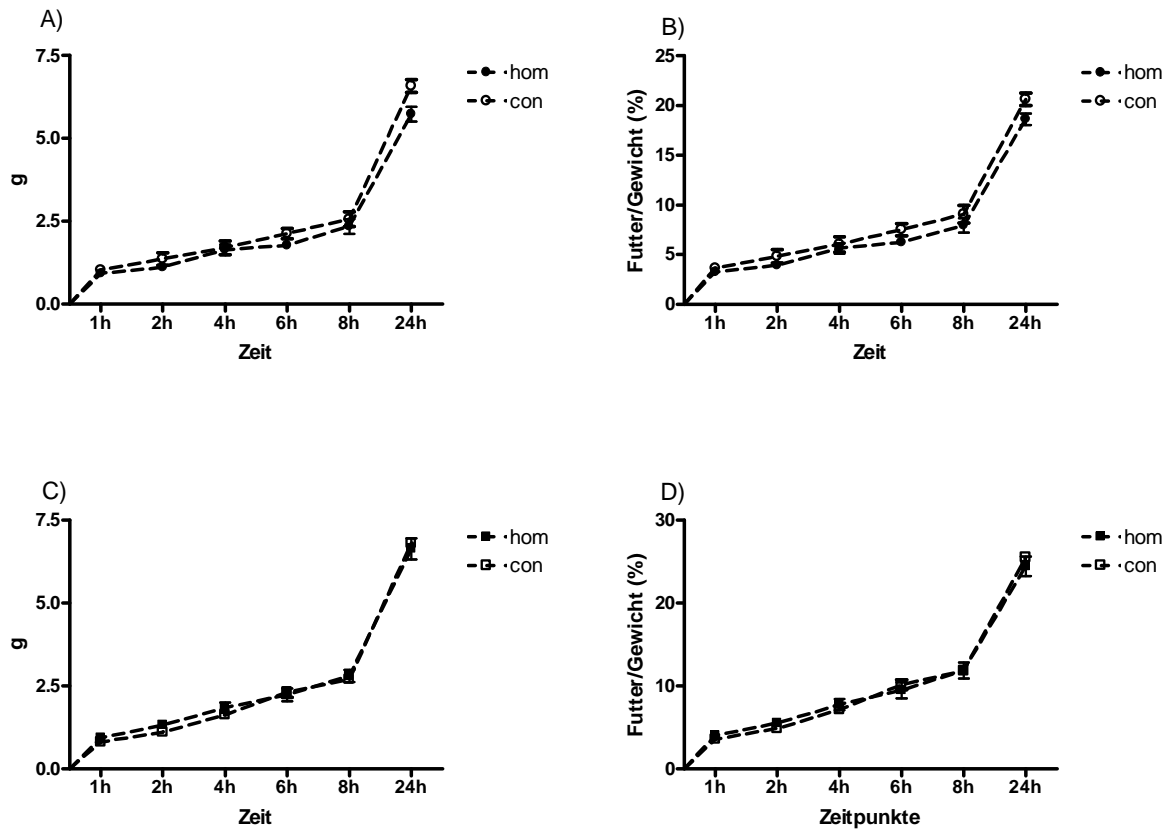


Abb. 36: Kumulative Futteraufnahme nach Futterentzug bei 3 bis 5 Monate alten $UCN2-OE^{con}$ und $UCN2-OE^{hom}$ Tieren. Aufgenommene Futtermenge der A) Männchen und C) Weibchen und die relativ zum Körpergewicht der B) Männchen und D) Weibchen gefressene Futtermenge.

Die älteren homozygot UCN2 überexprimierenden Männchen haben im Durchschnitt während des 16-stündigen Futterentzugs im Verhältnis zu den Kontrolltieren weniger Gewicht (-0,5g UCN2-OE^{hom} versus -1,5g UCN2-OE^{con}) verloren (Abb. 37). So erklärt sich vermutlich auch die anfangs niedrigere Futteraufnahme nach dem Entzug bei UCN2-OE^{hom} im Vergleich zu UCN2-OE^{con} Tieren (Abb. 38). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den *ad libitum* Ergebnissen, in denen die älteren UCN2-OE^{hom} mehr fressen als UCN2-OE^{con} Tiere. 24 Stunden nach dem Futterentzug fressen jedoch die überexprimierenden Mausmutanten wieder tendenziell mehr als die Kontrolltiere.

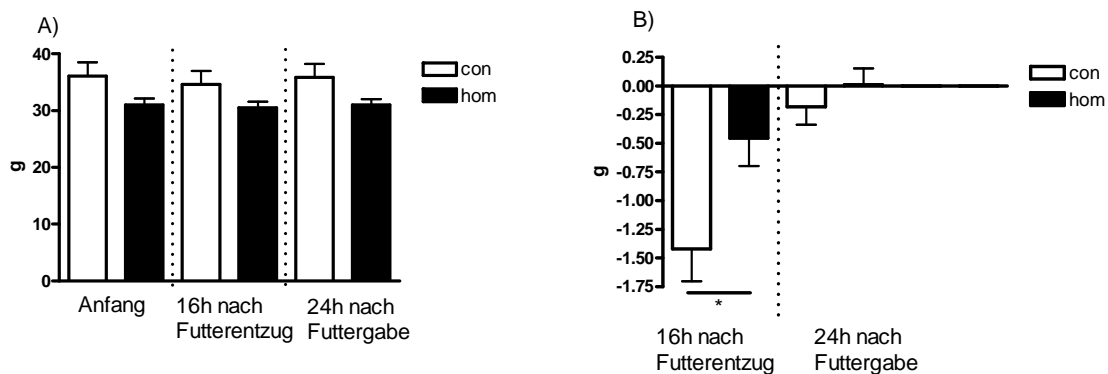


Abb. 37: Änderung des Körpergewichts nach Futterentzug bei 11 bis 12 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} männlichen Mäusen. A) Darstellung des Körpergewichts vor, direkt nach 16h Futterentzug und nach 24h erneuter Futtergabe. B) Aus dem Futterentzug resultierender Gewichtsverlust direkt nach dem Futterentzug und nach 24h Erholungsphase. *: $p < 0,05$ (Student *t*-Test)

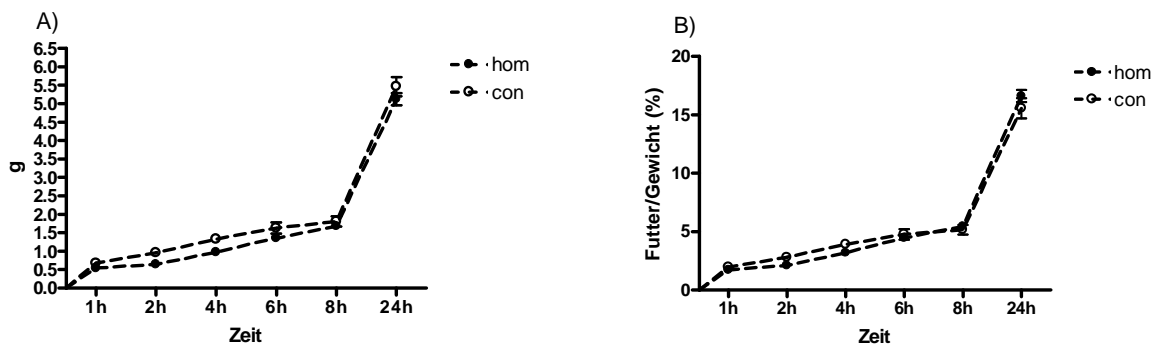


Abb. 38: Kumulative Futteraufnahme der 11 bis 12 Monate alten UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} männlichen Mäuse nach 16h Futterentzug. A) Darstellung der Futteraufnahme und B) der Futteraufnahme relativ zum Körpergewicht

5.7 Untersuchungen zum Metabolismus

Eine gestörte Stressachse und ein verändertes Futteraufnahmeverhalten gehen oft mit einem gestörten Stoffwechsel einher, daher wurden die Exkremente der Maus quantifiziert und analysiert.

Die Versuchstiere wurden in so genannten Metabolismuskäfigen gehalten. Diese Käfige haben einen Gitterboden, durch den die Ausscheidungen der Maus durchfallen können. Die einzelnen Kotabsonderungen wurden auf einem Filterpapier aufgefangen. Nach 24 Stunden wurde der Kot eingesammelt, die einzelnen „Kot-Pellets“ gezählt, gewogen und getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Trockengewicht der Kotproben bestimmt. Diese Prozedur wurde nach dem ersten Tag, den die Mäuse in dem Käfig verbracht haben und nach 7 Tagen Habituation durchgeführt.

UCN2-OE^{hom} Mäuse scheiden sowohl am Tag eins als auch am Tag sieben tendenziell mehr „Kot-Pellets“ aus als UCN2-OE^{con} Tiere. Rechnet man das Körpergewicht der Mäuse mit in die Kotausscheidung ein, wird deutlich, dass UCN2-OE^{hom} Mäuse signifikant mehr Kot-Pellets/ Körpergewicht ausscheiden. Das Gesamtgewicht der Kotmenge sowohl im nassen als auch im getrockneten Zustand ist jedoch zwischen den Genotypen nicht unterschiedlich (Abb. 39). Männliche UCN2-OE^{hom} Mäuse geben keine größere Kotmenge ab als UCN2-OE^{con} Männchen. Nur das Durchschnittsgewicht der einzelnen Kot-Pellets ist bei UCN2-OE^{hom} Tieren ca. 0,8-fach geringer und dadurch erhöht sich die Anzahl der Kot-Pellets (Abb. 40).

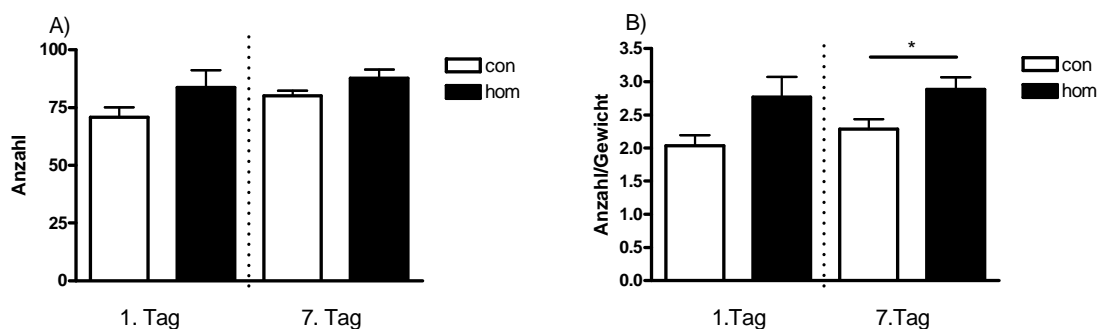


Abb. 39: Quantifizierung der Kotproben von männlichen UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen gehalten in Metabolismuskäfigen am ersten und am siebten Tag. A) Anzahl der Kot-Pellets und B) Anzahl der Kot-Pellets relativ zum Körpergewicht der Maus. *: $p < 0,05$; (Student t-Test).

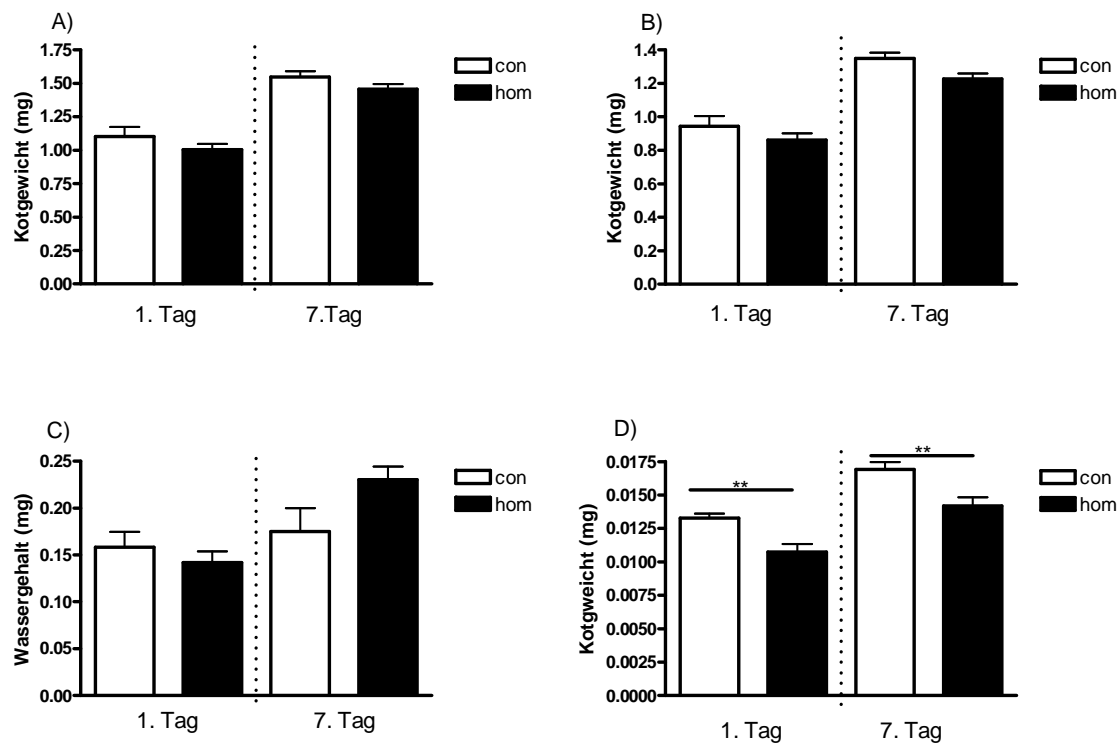


Abb. 40: Gewichtsanalyse der Kotproben von männlichen UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen gehalten in Metabolismuskäfigen am ersten und am siebten Tag. Gewicht der A) frisch eingesammelten, feuchten Kotproben und B) der getrockneten Kotproben. C) Errechneter Wassergehalt der Kotproben. D) Errechnetes Einzelgewicht eines „Kot-Pellets“. **:p < 0,01; (Student t-Test)

5.7.1 CORT-Werte aus den Kotproben

Anhand der Corticosteron-Metaboliten im Kot kann auf die adrenocorticotropale Aktivität der Nebennierenrinde der Maus geschlossen werden (Touma 2003).

Die getrockneten Kotproben wurden in einem MetOH-Gemisch aufgeschlemmt, um so die Corticosteron-Metaboliten zu lösen. In einem „Enzym Immuno Assay“ (EIA) wurde danach die Konzentration der Corticosteron-Metaboliten mit Hilfe eines Antikörpers gegen Steroide mit einer 5 α -3 β ,11 β -diol Gruppe detektiert. Die CORT-Metaboliten-Werte (CM-Werte) aus den Kotproben zeigen, dass UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Tiere am ersten Tag in der neuen Umgebung des Metabolismuskäfigs wesentlich mehr CORT produziert haben als nach sieben Tagen Eingewöhnungsphase. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die UCN2-OE^{hom} sowohl am ersten als auch am siebten Tag annähernd doppelt so viel CORT- Metaboliten im Kot aufweisen wie UCN2-OE^{con} Mäuse (Abb. 41).

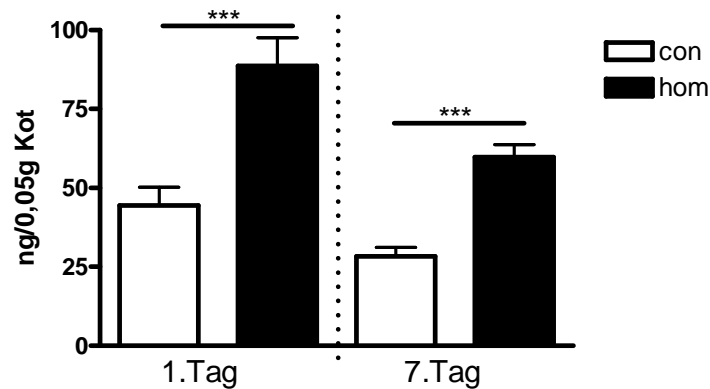


Abb. 41: CORT-Metaboliten Konzentration in 0,05g Kot bei UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Mäusen am ersten und am siebten Tag des Experiments. *: $p < 0,001$ (Student t-Test)**

5.7.2 Temperaturmessung

Die veränderten Metabolismusdaten wiesen daraufhin, dass die Mäuse möglicherweise einen veränderten Grundumsatz haben, was sich bei den meisten Lebewesen auch in einer veränderten Körpertemperatur zeigt. Bei der Analyse der Körpertemperatur der Mäuse, rektal gemessen, konnte jedoch weder ein Unterschied zwischen den Genotypen noch zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (Abb. 42).

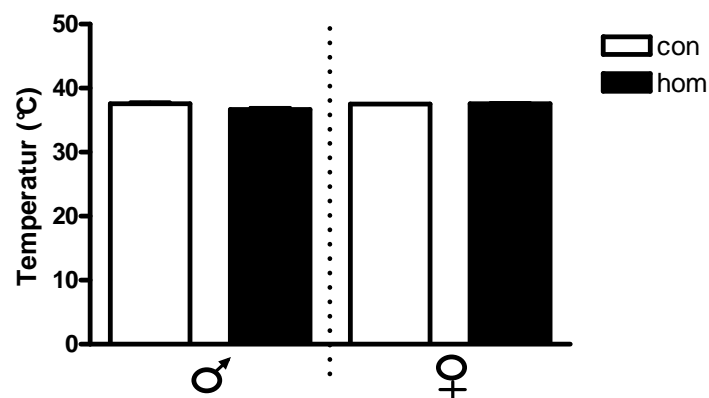


Abb. 42: Ergebnisse aus der Messung der Körpertemperatur von UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Männchen und Weibchen im Alter von 3 bis 5 Monaten.

5.8 Fettmessung

Es ist bekannt, dass depressive Menschen einen höheren intraabdominalen, viszeralen Fettanteil aufweisen als Gesunde. Daher wurden in diesem Versuch die Mäuse mit Hilfe eines fMRI auf ihr viscerales Fettgewebe hin untersucht. Magnetresonanztomographie (MRT) ist

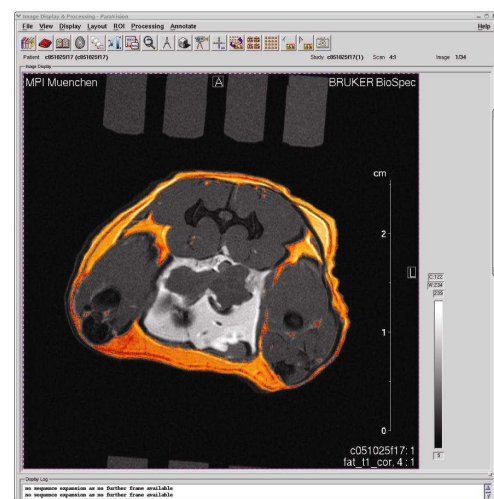
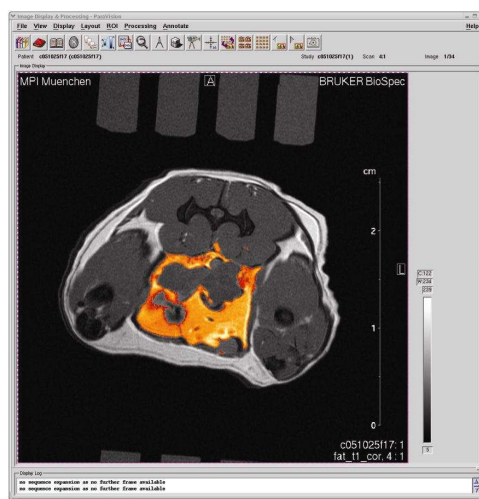
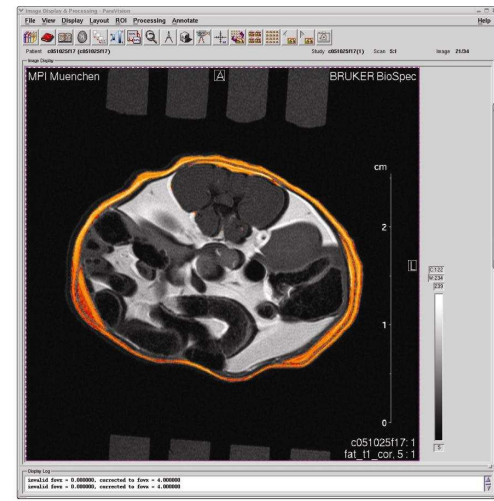
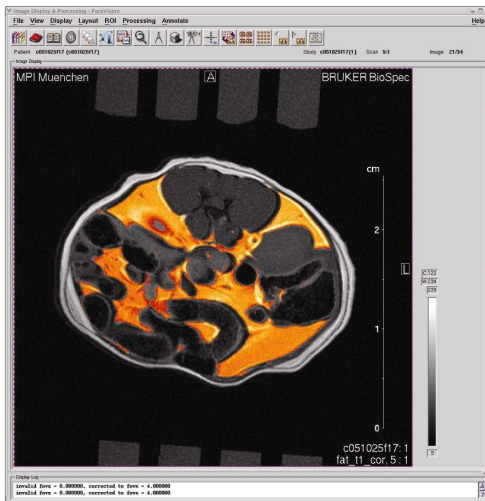
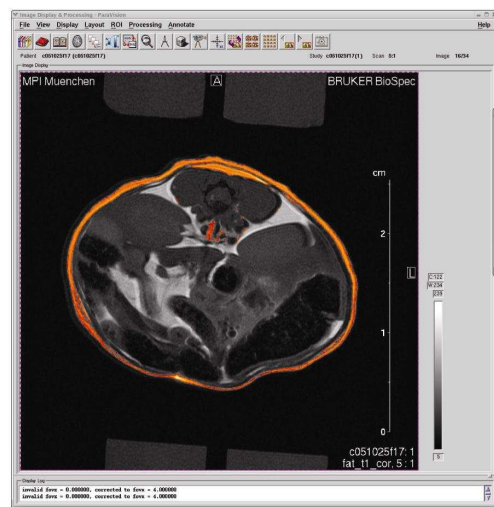
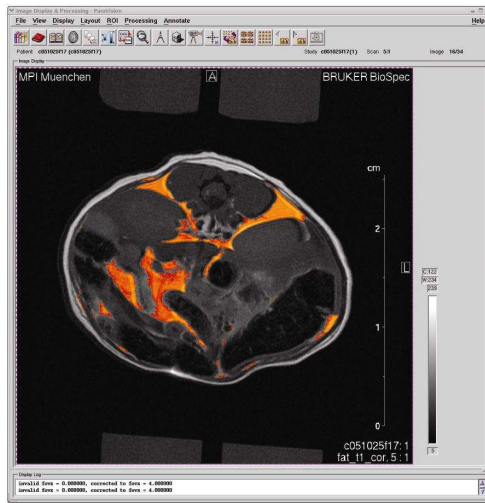
ein bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Strukturen im Inneren des Körpers. Mit einer MRT kann man Schnittbilder des menschlichen oder tierischen Körpers erzeugen, die die nicht-invasive Beurteilung der Organe und mögliche Organveränderungen erlauben.

Durch dieses moderne Verfahren können fetthaltige Gewebe, neben Knochen, Hohlräumen und Organen dargestellt und differenziert werden. Es kann ein klarer Unterschied zwischen subcutanem und visceralem Fett gemacht werden (Abb. 43). In unserem Versuch wurden je fünf UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} Tiere mit dieser Methode untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Fettgehalt zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es konnte lediglich eine Tendenz gezeigt werden, dass UCN2-OE^{hom} Tiere mehr viscerales versus subcutanem Fett besitzen als UCN2-OE^{con} Tiere (Abb. 44). Der Fettgehalt insgesamt unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (Abb. 44).

Viscerales Fettgewebe

Subcutanes Fettgewebe

anterior



posterior

Abb. 43: Repräsentative Abbildung zur Visualisierung und Quantifizierung von visceralem und subcutanem Fett in fMRT Bildern.

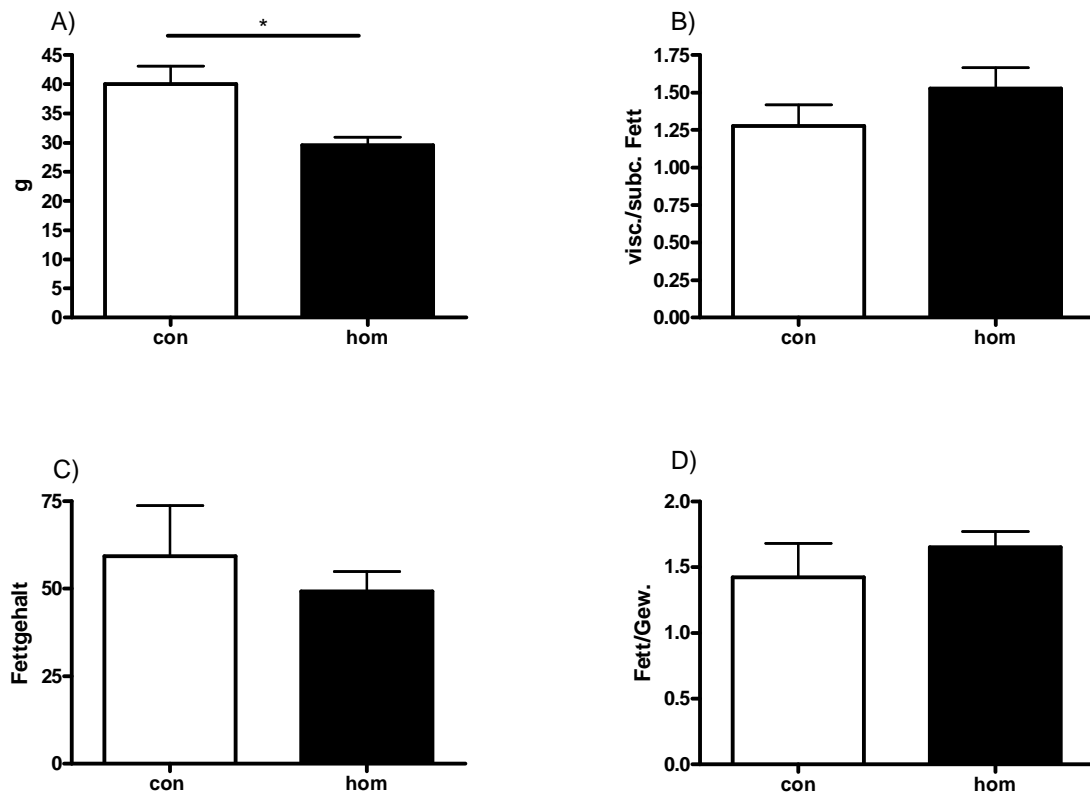


Abb. 44: Graphische Darstellung der Analyse der Fettmessung an UCN2-OE^{con} und UCN2-OE^{hom} 10 bis 11 Monate alten männlichen Mäusen
A) Körpergewicht und B) visceralen/subcutanem Fettgehalt C) gesamter Fettgehalt D) Fettgehalt pro Körpergewicht*: $p < 0,05$ (Student t-Test)

6 Diskussion

6.1 Generierung einer konditionalen UCN2 überexprimierenden Mauslinie

UCN2 ist eines der beiden erst 2001 entdeckten CRH-verwandten Neuropeptide. Die Funktion und die Wirkungsweise dieses CRH-R2 aktivierenden Moleküls sind noch weitgehend unbekannt. Die meisten Erkenntnisse über dieses Neuropeptid beruhen auf Applikationsstudien in diverse Geweben und Hirnregionen der Maus und Ratte. Diese invasive Methode wird mit unphysiologischen Konzentrationen durchgeführt und kann so nur Hinweise auf die akute Wirkung von UCN2 geben. Die dieses Jahr veröffentlichte UCN2-*knock out* Mauslinie untersucht die geschlechtsspezifischen Auswirkungen des Verlusts von UCN2 (Chen et al., 2006). Die Folgen einer Überexpression von UCN2 und die daraus resultierende chronische Aktivierung des CRH-R2 sind noch nicht untersucht worden.

In der von uns generierten UCN2 überexprimierenden Mauslinie kann UCN2 in spezifischen Geweben oder zu bestimmten Zeitpunkten in der Maus vermehrt exprimiert werden. Diese konditionale Aktivierung wurde durch die Integration eines konditional kontrollierbaren Genkonstrukts in den ubiquitär exprimierten *Rosa26* Locus ermöglicht. Dieses Konstrukt besteht aus einer durch die Cre-Rekombinase entfernbaren Stoppkassette, die die Transkription der darauf folgenden UCN2 cDNA verhindert. Das Prinzip, ein Gen konditional im *R26* Locus überzuexprimieren, wurde schon erfolgreich bei der konditional CRH überexprimierenden Mauslinie angewandt (Lu, 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl das Neuropeptid CRH als auch das Reportergen LacZ in allen Cre-Rekombinase exprimierenden Regionen transkribiert und synthetisiert wird. Der *R26* Locus wurde außerdem erfolgreich für Reportermäuse, die LacZ, EGFP oder Luciferase exprimieren verwendet (Mao et al., 2001; Safran et al., 2003; Soriano, 1999).

Dieses neu generierte Mausmodell eröffnet die Möglichkeit gezielt durch verschiedenste Cre-Mauslinien (Nagy, 2001) oder Injektion von viralen Cre-Rekombinase exprimierenden Vektoren die Wirkung von UCN2 in zentralen und peripheren Geweben der Maus zu testen (Nagy, 2000).

6.2 UCN2 Überexpression im ZNS

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Frage nach der Bedeutung von UCN2 im ZNS. Aus diesem Grund wurde die *Nestin-Cre* Mauslinie (Tronche et al., 1999) in die UCN2-OE Mauslinie eingekreuzt, um so eine spezifische UCN2 Überexpression im ZNS zu gewährleisten.

Die in den *R26* Locus integrierte UCN2 cDNA wird im gesamten Gehirn exprimiert. Die Ergebnisse der LacZ Färbung bestätigen die Aktivität des *R26* Promotors und der Cre-Rekombinase in sämtlichen Zellen des ZNS. Weitere Gewebe, wie z.B. Herz, Lunge, Leber und Niere dieser Mausmutante, die keine Cre-Rekombinase exprimieren, zeigten keine Aktivität des LacZ Gens. Zusätzlich bestätigt die *in situ*-Hybridisierung mit einer UCN2 spezifischen RNA-Sonde die gendosisabhängige Überexpression von UCN2 im ZNS. Mit Hilfe dieser neu generierten Mausmutante kann die Rolle von UCN2 im ZNS genauer untersucht werden.

6.3 Expressionsanalyse CRH- relevanter Gene

Zunächst haben wir die Expression von CRH-R2, dem endogenen Rezeptor von UCN2, im Gehirn näher analysiert. Häufig regulieren bzw. beeinflussen Liganden die Expression ihrer Rezeptoren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass in der UCN2-*knock out* Mauslinie der Verlust des Liganden UCN2 zu einer erhöhten Expression der CRH-R2 mRNA im lateralen Septum, im dorsalen *Ncl. raphe* und im BNST im Vergleich zu Wildtyptieren führt (Chen et al., 2006). Mehrere Studien beschreiben, wie die Stimulation des CRH-R2 zu einer differenzierten Regulation der Expression des Rezeptors führen kann. Brunson et al. zeigen jedoch, dass die CRH Applikation im Gehirn zu keiner Expressionsveränderung des CRH-R2 führt (Brunson et al., 2002).

Wir haben in unserem Mausmodell ebenso erwartet, dass die verstärkte Expression von UCN2 die Expression seines Rezeptors CRH-R2 verändert. Wir konnten aber keinen Einfluss von UCN2 auf die Expression von CRH-R2 feststellen. Wahrscheinlich beeinflusst UCN2 nicht direkt die Transkription von CRH-R2. Die Kompensation muss also auf einem anderen Weg vonstattengehen. Möglicherweise kann UCN2 die Aktivität oder die Verfügbarkeit des CRH-R2 Proteins beeinflussen. Bei gestressten Ratten, denen die Nebennieren entfernt wurden, stellte man fest, dass die Menge an CRH-R1 mRNA in der Hypophyse unverändert bleibt, obwohl mehr CRH-R1 Protein im Western Blot detektierbar ist. Über einen Liganden-

Bindungs-Assay konnte in diesem Gewebe gezeigt werden, dass es zu einer geringeren Bindung von CRH an den Rezeptor kommt (Aguilera et al., 2004). Diese Ergebnisse legen dar, dass die Menge der mRNA nicht unbedingt in direktem Zusammenhang mit der vorhandenen Menge an Protein steht und dass der Rezeptor auch über Desensitisierung reguliert werden kann. Um eine Überstimulation in der UCN2-OE Mauslinie zu verhindern, könnte es ebenso zu einer Rezeptordesensitisierung gekommen sein. Ein Liganden-Bindungs-Assay und immunhistochemische Nachweismethoden könnten darüber Aufschluss geben, da diese Nachweisverfahren präzisere und quantitative Aussagen über die Menge des Rezeptors im Cytoplasma und der Zellmembran geben. Die Verwendung dieser Methode ist jedoch limitiert, da es noch keinen zuverlässigen CRH-R2 Antikörper gibt und der Liganden-Bindungs-Assay schwer zu quantifizieren ist und somit geringere Unterschiede nur schwer nachweisbar sind.

Des Weiteren wurde die Expression der endogenen Liganden des CRH-R2 in UCN2 überexprimierenden Mäusen untersucht. UCN3 ein Ligand, der ausschließlich an den CRH-R2 bindet und somit in Konkurrenz zu UCN2 stehen könnte, zeigt weder im Hypothalamus noch in der Amygdala ein verändertes Expressionslevel. CRH und UCN scheinen ebenfalls unverändert exprimiert zu werden. In der UCN2-*knock out* Mauslinie führt der Verlust von UCN2 zu einer erhöhten Expression von CRH im BNST und der zentralen Amygdala. Die Expression von UCN bleibt unverändert, die des UCN3 wird hingegen im medianen *Ncl. preopticus* und der *perifornical area* reduziert (Chen et al., 2006). Einen solchen Einfluss des UCN2 auf die Expression der anderen CRH-R2 Liganden konnten wir nicht feststellen. Entweder findet die Regulation nicht auf Transkriptionsebene, sondern auf Proteinebene statt oder UCN2 konkurriert nicht mit CRH, UCN bzw. UCN3 um den Rezeptor. Somit gäbe es aus Sicht der Zelle keine Veranlassung die Transkription der Liganden zu verändern. Eine weitere Möglichkeit wäre es, dass UCN2 an das CRH-bindende Protein (CRH-BP) bindet und dass dadurch das biologische Gleichgewicht reguliert wird. Jahn und seine Kollegen konnten zeigen, dass Maus UCN2 mit hoher Affinität an das Ratten CRH-BP binden kann (Jahn et al., 2004). Das CRH-BP ist außerdem in subcorticalen, limbischen Strukturen, *Ncl. raphe* und verschiedenen Kernen im Stammhirn exprimiert und könnte in diesen Regionen dazu beitragen, dass UCN2 die Expression der anderen CRH-R2 Liganden nicht verändert (Potter et al., 1992). In Zukunft sollte in weiteren Versuchen überprüft werden, ob die Expression des CRH-BP verändert ist, und ob Maus UCN2 an Maus CRH-BP binden kann. Außerdem sollte man immunhistochemische Analysen anfertigen, die die möglichen Unterschiede in der Peptidmenge der Liganden CRH, UCN bzw. UCN3 aufzeigen könnten.

Der Rezeptor CRH-R1, der aufgrund der geringen Bindungsaffinität zu UCN2 nur bei hoher Konzentration dieses Neuropeptids aktiviert wird, zeigt veränderte Expressionsstärken in verschiedenen Regionen.

Im *reticular thalamic Nucleus* (RT), einem Kern der *Formatio reticularis* wird der CRH-R1 aufgrund des Überschusses an UCN2 verstärkt exprimiert. Der Thalamus bildet im Diencephalon die Schaltzentrale für das sensorische System. In diesem Hirnareal werden sensorische Informationen mit Informationen aus dem Kleinhirn und den Basalganglien verrechnet und an den Neocortex weitergegeben. Der Thalamus trägt somit zur korrekten motorischen Aktivität, z.B. Muskeltonus und Körperhaltung, bei. Über die Funktion von CRH-R1 und die Auswirkungen einer Überexpression in diesem Bereich ist jedoch noch nichts bekannt. In Untersuchungen, in denen CRH i.c.v. injiziert wurde, erhöhte sich die motorische Aktivität von Mäusen bzw. Ratten (Ohata and Shibasaki, 2004; Valdez et al., 2002). Vielleicht erfolgt diese Aktivierung über die Stimulation der CRH-R1 Rezeptoren im Thalamus.

Der *Ncl. ruber* im Mesencephalon steht in engem Kontakt zum Thalamus. Auch hier werden Bewegungen gesteuert und kontrolliert. Der *Ncl. ruber* bildet eine Schaltstelle zwischen motorischen Kernen im Halsmark und dem Kleinhirn, das so genannte extrapyramidale motorische System. Auch in diesem Kern ist der CRH-R1 in UCN2-OE Mäusen vermehrt exprimiert. Welche Aufgabe der CRH-R1 in diesem Bereich übernimmt, ist jedoch noch unbekannt. Wie wir aber in unseren Verhaltensexperimenten sehen konnten, zeigen UCN2-OE Mäuse eine erhöhte Aktivität im *Open field* Test und im FST.

Im Hippocampus, der zentralen Schaltstelle des limbischen Systems im Telencephalon, wird der CRH-R1 in der CA1 Region in UCN2-OE Mäusen in seiner Expression reduziert. Im Hippocampus fließen sensorische und emotionale Informationen zusammen. Außerdem konnte in einer Vielzahl von Experimenten gezeigt werden, dass der Hippocampus insbesondere für die Gedächtnisbildung eine zentrale Rolle spielt. Weiterhin wurde beschrieben, dass ein Zusammenhang zwischen Depression und dem Verlust von hippocampalen Zellen besteht (Lee et al., 2002). Zudem wurde nachgewiesen, dass CRH und Urocortin, nicht aber UCN2, eine neuroprotektive Wirkung über den CRH-R1 auf primäre hippocampale Neuronen haben (Pedersen et al., 2002). Erhöhte UCN2 Expression führt zu erniedrigter CRH-R1 Expression im Hippocampus. Daher wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, ob die reduzierte Expression des CRH-R1 Einfluss auf die neuroprotektive Wirkung des CRH-R1 nimmt.

Wir haben desweiteren die Amygdala, ein Hirnareal, welches Teil des limbischen Systems ist, in Bezug auf die veränderte CRH-R1 Expression hin untersucht. Dieses Areal ist an der Wahrnehmung und Erinnerung jeglicher Form von Erregung, z.B. Angst oder Lust, beteiligt (Carlson et al., 2006; Thompson, 2001; Trepel, 1999). Über die Efferenzen der Amygdala zum Hypothalamus wird der Sympathikus aktiviert und in der *Formatio reticularis* können Reflexe verstärkt werden. Zusätzlich nimmt die Amygdala über den PVN Einfluss auf die HPA-Achse (Thompson, 2001). Diese Schnittstelle für emotionale Empfindungen und Reaktionen exprimiert in starkem Maße den CRH-R1. Jedoch ist die Expressionsstärke in der Amygdala von UCN2 anscheinend unabhängig, da wir anhand von *in situ*-Hybridisierungen keinen Unterschied zwischen überexprimierenden- und Kontroll-Mäusen feststellen konnten. Im Vergleich dazu kommt es in der UCN2-*knock out* Maus zu keiner Veränderung der CRH-R1 Expression im Gehirn (Chen et al., 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der Expressionsstudie von relevanten Peptiden und Rezeptoren im CRH-System in UCN2-OE und Kontroll-Mäusen lediglich ein Unterschied in der Expression von CRH-R1 festgestellt werden konnte. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass UCN2 nur Einfluss auf die Expression des CRH-R1 nimmt, ohne auch Effekte auf das Expressionslevel von CRH-R2 zu haben. Entweder läuft die Anpassung an das überschüssige UCN2 nicht auf der Transkriptionsebene ab, oder die Sensitivität der *in situ*-Hybridisierung ist nicht ausreichend, um geringe Veränderungen nachzuweisen. Die Expressionsunterschiede des CRH-R1 zwischen den Genotypen kann über sekundäre oder tertiäre Regulations- bzw. Rückkopplungsmechanismen ausgelöst worden sein. So ließe sich auch die Diskrepanz zwischen der UCN2-*knock out* und unserer UCN2 überexprimierenden Mauslinie erklären. Gäbe es einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von UCN2 und CRH-R1, so müsste man im UCN2-*knock out* eine Expressionsveränderung feststellen. Welche Adaptationsmechanismen in der UCN2-OE Mauslinie ablaufen, die zu unterschiedlicher Regulation des CRH-R1 führen, kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Injektionsstudien, die die akute Wirkung und mögliche Signaltransduktionswege von UCN2 näher beleuchten können, könnten hier Aufschluss bringen.

6.4 Stresshormone im Blutplasma

In unseren Untersuchungen haben wir festgestellt, dass UCN2 die stressbedingte Erhöhung der CORT-Konzentration im Blut der Mäuse beeinflusst. UCN2 überexprimierende Männchen zeigen 10 Minuten nach Immobilisationsstress einen Anstieg von CORT im

Blutplasma. Die Erhöhung liegt aber nur bei 80% des Wertes der Kontrolltiere. Die basalen CORT-Spiegel in Männchen und Weibchen zeigen keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Jedoch ist der ACTH-Spiegel bei gestressten UCN2 überexprimierenden Männchen im Vergleich zu den Kontrollmännchen 30 Minuten nach Stress im Durchschnitt 1,5-fach erhöht (Abb. 22). Auch der CORT-Wert steigt 30 Minuten nach Stress bei UCN2 überexprimierenden Tieren tendenziell mehr an als bei den Kontrolltieren. Die HPA-Achse scheint etwas Zeit verzögert zu reagieren. Die akute CORT-Ausschüttung sowie die Rückkopplungseffekte sind leicht inhibiert. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des CRH-R2 die Stressantwort vermindert (Bale et al., 2000). In der Studie von Bale und ihren Kollegen wurde ein schneller Anstieg von CORT und ACTH in *CRH-R2-knock out* Mäusen festgestellt. Auch Coste und seine Kollegen konnten zeigen, dass ein CRH-R2 Verlust bei weiblichen Mäusen 2 Minuten nach dem Stressor zu einer erhöhten ACTH Ausschüttung führt. 10 Minuten danach sind die ACTH-Spiegel jedoch niedriger als in den Kontrolltieren (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000). Diese Ergebnisse unterstützen unsere Resultate. Beim *knock out* des CRH-R2 Rezeptors zeigt sich nach Immobilisationsstress eine akute Erhöhung und bei der Überexpression des CRH-R2 Agonisten eine akute Erniedrigung der Stresshormone. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer veränderten Rückkopplung, so dass bei der *CRH-R2-knock out* Maus die Konzentration von ACTH erniedrigt und in der UCN2 überexprimierenden Maus ACTH erhöht ist. Die CORT-Werte lassen sich mehrere Minuten nach Stress leider nicht in diesen Zusammenhang einreihen. Hier zeigen Coste und seine Kollegen, dass es bei *CRH-R2-knock out* Mäusen zu einer lang anhaltenden Erhöhung der CORT-Werte im Blut kommt (Coste et al., 2000). Diese Resultate zeigen, dass die Aktivierung des CRH-R2 modulierend in die HPA-Achsen Aktivität einwirkt. Weitere Hinweise dazu lieferte auch der Doppel-*knock out* von CRH-R1 und CRH-R2 in dem die Reaktivität der HPA-Achse noch geringer ist als im alleinigen *CRH-R1-knock out* (Bale et al., 2002; Preil et al., 2001). Um einen besseren Einblick in die Auswirkung von UCN2 auf die Stresshormone zu bekommen, müssen noch weitere Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten basal und nach Stress von UCN2 überexprimierenden Mäusen gesammelt und untersucht werden.

In *UCN2-knock out* Mäusen konnte ebenso ein Unterschied im Stresshormonhaushalt festgestellt werden. Ungestresste *UCN2-knock out* Weibchen zeigten kurz vor der aktiven Phase im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte CORT- und ACTH-Werte (Chen et al., 2006). Bei genauerer Analyse konnten Chen und seine Kollegen einen Zusammenhang zwischen den veränderten Hormonwerten und einem veränderten Tagesrhythmus der Weibchen feststellen.

In unseren Experimenten waren die Weibchen unauffällig und zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dieser Effekt könnte dadurch begründet sein, dass wir die Mäuse nicht in ihrem Östruszyklus synchronisiert hatten. Östrogen kann die Reaktivität der HPA-Achse verändern (Chen et al., 2006). Sind die Weibchen nicht synchronisiert, kann es zu einer starken Streuung der untersuchten Werte kommen, die eine konkrete Schlussfolgerung dann nicht mehr zulassen. Um also eine zuverlässige Aussage über die Veränderung der Stresshormone bei Weibchen treffen zu können, sollten diese Experimente nach einer Synchronisation des Östruszyklus erfolgen.

6.5 Untersuchungen zum Verhalten von UCN2 überexprimierenden Mäusen

6.5.1 Dark/ Light Box Test

In der *Dark/ Light Box* wird die angeborene Neugier der instinktiven Ängstlichkeit der Mäuse gegenübergestellt. Mäuse, die sehr „mutig“ sind verlassen rascher den dunklen Teil der Box und halten sich vermehrt im hellen Teil der Box auf und erkunden diesen.

In unserem ersten Versuch mit 10 bis 11 Monate alten Mäusen waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen in den verschiedenen Parametern zu verzeichnen. Beide Genotypen hielten sich aber ungewöhnlich lange im dunklen Kompartiment auf. Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass die Helligkeit von 700 Lux für die Tiere zu einer so großen Aversion gegen den hellen Teil der Box führte, dass sie unabhängig vom Genotyp diesen mieden. Borbely und seine Kollegen haben festgestellt, dass die Lokomotion von der Intensität des Lichtes abhängt. Die lokomotorische Aktivität wird um so geringer, je höher die Lichtintensität wird (Borbely et al., 1975). Daher wurde das Experiment mit jungen (3 bis 5 Monate alten Mäusen) bei 300 Lux im hellen Kompartiment wiederholt. Die zuvor geäußerte Vermutung, dass die Lichtverhältnisse die Resultate des Experiments zu stark beeinflusst hätten, ließ sich dadurch jedoch nicht bestätigen. Auch in diesem Versuch bevorzugten die Mäuse beider Genotypen den dunklen Teil der Box, obwohl die Lichtintensität im hellen Teil nun sehr gering war. Was die Mäuse dazu veranlasst hatte, den hellen Teil zu meiden und sich die meiste Zeit im dunklen aufzuhalten, bleibt spekulativ. Dieser Test ergab keine Unterschiede hinsichtlich des Angstverhaltens zwischen den UCN2 überexprimierenden Mäusen und den Kontrolltieren. Möglicherweise hat die Aktivierung des CRH-R2 keine Auswirkung auf das Angstverhalten der Maus in der *Dark/Light Box*. Denn auch in den CRH-

R2-*knock out* Mäusen verglichen mit Wildtypmäusen kommt es in der *Dark/Light Box* (bei 400 lx) zu keinem Genotyp spezifischen Unterschied (Bale 2000). Henry und seine Kollegen konnten zudem zeigen, dass UCN2, ins laterale Septum injiziert, nur in einer sehr hohen Dosis (240pmol) zu einem erhöhten Angstverhalten in der *Dark/Light Box* (bei 1000 lx) führt. Sie zeigten außerdem, dass das angsthafte Verhalten durch vorausgehenden Stress gesteigert werden kann. Gestresste Mäuse reagierten schon auf 48pmol UCN2 mit erhöhtem Angstverhalten in der *Dark/Licht Box* (Henry et al., 2006). Um diesen stressabhängigen Effekt auch in UCN2 überexprimierenden Mäusen zu untersuchen, sollten diese Mäuse künftig nach 30 Minuten Immobilisationsstress nochmals in der *Dark/Light Box* getestet werden.

6.5.2 *Open field Test*

Der *Open field Test*, mit dem man die allgemeine lokomotorische Aktivität und das Explorations-Verhalten der Tiere untersucht, zeigte Unterschiede zwischen den Genotypen in beiden Altersgruppen. Die Überexpression von UCN2 führt zu einer erhöhten Aktivität der Mäuse. Sowohl die Anzahl der *Rearings* als auch die zurückgelegte Strecke pro Zeitintervall weisen daraufhin, dass die UCN2-OE Mäuse aktiver und erregter sind als ihre Geschwister aus der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Injektionsstudien, in denen gezeigt wurde, dass UCN2 i.c.v. die motorische Aktivität reduziert (Ohata and Shibasaki, 2004; Valdez et al., 2002; Zorrilla et al., 2004). Henry und seine Kollegen haben gezeigt, dass UCN2 injiziert in das laterale Septum in sehr hohen Dosen oder nach 30 Minuten Stress reduzierende Auswirkungen auf die Lokomotion der Maus hat (Henry et al., 2006). Die UCN2-*knock out* Mäuse zeigen hingegen keine lokomotorischen Veränderungen (Chen et al., 2006). Bei den CRH-R2-*knock out* Mäusen von Bale und Kishimoto konnte im *Open field Test* lediglich ein erhöhtes ängstliches Verhalten, aber keine Änderung der lokomotorischen Aktivität festgestellt werden (Bale et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). In unserem Versuchsaufbau war die Auswertung bezüglich des ängstlichen Verhaltens nicht möglich, daher kann nur eine Aussage über die Lokomotion getroffen werden. Der Grund für die konträren Ergebnisse könnten kompensatorische Effekte wie z.B. die Veränderung der Expressionsstärke von CRH-R1 im limbischen System sein. Ohata und Valdez konnten z.B. zeigen, dass CRH die motorische Aktivität erhöht, und dass dieser Effekt von UCN2 revidiert werden kann (Ohata and Shibasaki, 2004; Valdez et al., 2002). Bei einer ständigen

Überexpression von UCN2 könnte dies zu einem „übersteuerten“ Kompensationseffekt führen und somit zu einer erhöhten Lokomotion.

6.5.3 *Forced Swim Test*

Die Ergebnisse des *Forced Swim Tests* mit älteren Mäusen unterstützen die Vermutung, dass UCN2-OE Tiere eine erhöhte Aktivität aufweisen. Sie bewegen sich im Wasser signifikant mehr als ihre Kontrollgeschwister. Die Tendenz sich treiben zu lassen (*floating*), ist geringer. Jüngere UCN2 überexprimierende Mäuse zeigen hingegen keinen Unterschied in den untersuchten Parametern im Vergleich zu Kontrolltieren, was auf eine Altersabhängigkeit des Effektes hindeutet. Masuda und seine Kollegen zeigten in ihren Experimenten, dass sich das Verhalten im FST mit dem Alter und dem Geschlecht verändert (Masuda et al., 2001). Die Resultate des FST mit älteren UCN2 überexprimierenden Mäusen stehen im Einklang mit denen der CRH-R2-*knock out* Mäuse. Denn diese zeigen eine erhöhte Immobilität im FST (Bale and Vale, 2003). Die UCN2-*knock out* Weibchen verhalten sich jedoch widersprüchlich dazu, denn sie zeigen eine erniedrigte Immobilität und vermehrtes Schwimmen im FST (Chen et al., 2006). Da das *Floating* im FST als depressionsähnliches Verhalten gewertet wird (Cryan et al., 2002; Porsolt, 2000), kann man sagen, dass ältere UCN2-OE Tiere eine aktivere Stressbewältigungsstrategie zeigen und daher vermindertes depressionsähnliches Verhalten aufweisen.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass UCN2-OE Mäuse aktiver als Kontrollmäuse sind. Ob die erhöhte Aktivität mit einem reduzierten depressiven Verhalten in Zusammenhang steht, müsste in weiteren Experimenten wie z.B. bei unkontrollierbarem Stress und erlernter Hilflosigkeit genauer untersucht werden. Injektionsstudien zeigen jedoch, dass UCN2, injiziert in den DRN, zu einer verstärkten Reaktion auf erlernte Hilflosigkeit führt (Hammack et al., 2003b).

6.5.4 *Tail Suspension Test*

Im *Tail Suspension Test* (Steru et al., 1985) wird erhöhte Immobilität ebenso wie im FST einem eher depressiven Verhalten zugeschrieben. Die erhöhte Immobilität kann von bestimmten Antidepressiva wieder revidiert werden (Bai et al., 2001; Porsolt, 2000). Jedoch entspricht der aversive Stimulus des TST nicht exakt dem des FST. Im TST fehlt der zusätzliche Stressfaktor, hervorgerufen durch den Körpertemperaturverlust im 24-26°C

warmen Wasser. Deshalb kann man die Ergebnisse dieser Tests, die beide auf *behavioral despair* ausgerichtet sind, nicht ohne weiteres vergleichen. Beim TST konnten wir bei UCN2 überexprimierenden Mäusen weder bei den alten noch bei jungen Tieren einen Unterschied im Verhalten zu Wildtyptieren feststellen. UCN2-*knock out* Weibchen zeigen hingegen eine verringerte Immobilität (Chen et al., 2006). Die UCN2-*knock out* Männchen reagieren weder im FST noch im TST mit verändertem depressionsartigem Verhalten. Die widersprüchlichen Resultate der verschiedenen Studien könnten durch die jeweiligen Versuchsanordnungen, den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mauslinien oder in verschiedenen Adaptationsmechanismen begründet sein. Wie Henry und seine Kollegen zeigen konnten, potenziert Stress die Wirkung von UCN2 (Henry 2006). Der Stresspegel der Maus beeinflusst die Ergebnisse der Verhaltensexperimente. Daher wäre es interessant, wenn man in künftigen Versuchen die UCN2 überexprimierenden Mäuse *post* Stress untersuchen würde.

6.6 Fressverhalten der Mäuse

In einer Vielzahl von Injektionsstudien konnte gezeigt werden, dass UCN2 die Futteraufnahme in Mäusen und Ratten verringert (Hsu and Hsueh, 2001; Inoue et al., 2003; Ohata and Shibasaki, 2004; Reyes et al., 2001; Zorrilla et al., 2004). Auch in unserem Experiment konnten wir bei jungen Männchen im *ad libitum* Futtergabe Versuch zeigen, dass die Futteraufnahme, durch die Überexpression von UCN2 im Gehirn, verringert ist. Bei jungen Weibchen ist dieser Effekt geringer. Die anfängliche Tendenz der UCN2 überexprimierenden Weibchen weniger zu fressen als ihre Kontrollgeschwister könnte jedoch einen Hinweis darauf geben, dass die Funktion von UCN2 auch bei der Futteraufnahme in Weibchen eine Rolle spielt, aber von anderen geschlechtsspezifischen Mechanismen überlagert wird. UCN2 defiziente Weibchen zeigen ein verändertes Futteraufnahme- und Trinkverhalten (Chen et al., 2006). Um eine bessere Aussage über das Fressverhalten bei UCN2 überexprimierenden Weibchen treffen zu können, müsste man den Östruszyklus der Versuchstiere synchronisieren, um vergleichbare Resultate zu erzielen. Weibchen scheinen auch eine andere Futtermittelverwertung als Männchen zu haben, da bei ihnen das Verhältnis von Futter zu Körpergewicht größer ist. Diesen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Futtermittelverwertung haben auch schon andere Arbeitsgruppen festgestellt (Ehrich et al., 2005). Die reduzierte Futteraufnahme bei jungen UCN2 überexprimierenden Männchen schlägt sich allerdings nicht im Gewicht der Mäuse nieder. UCN2 überexprimierende junge Männchen wiegen durchschnittlich gleich so viel wie die Kontrolltiere, fressen jedoch im Laufe des

Tages wesentlich weniger Futter. Die geringere Futteraufnahme bei gleichem Gewicht ließe sich durch eine geringere körperliche Aktivität oder aber eine unterschiedlich effiziente Futtermittelverwertung erklären. Die durchgeführten Verhaltenstests können dies aber nicht bestätigen, da wir im *open field* Test eine höhere körperliche Aktivität der UCN2-OE Tiere festgestellt haben. Eine andere Erklärung für unsere Beobachtungen wäre, dass UCN2 Einfluss auf die Magenentleerung und Darmtätigkeit hat, was bereits durch i.c.v. Applikation von UCN2 nachgewiesen wurde (Martinez et al., 2004a; Martinez et al., 2004b; Martinez et al., 2002).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von älteren männlichen UCN2 überexprimierenden Tieren. Diese Männchen wiegen signifikant weniger als Kontrollgeschwister, nehmen aber mehr Futter pro Körpergewicht zu sich. Hier liegt eher der Schluss nahe, dass die UCN2 überexprimierenden Tiere die zugeführte Energie in Form von Pellets anders verwerten als die Tiere der Kontrollgruppe. Ob dieser Effekt altersbedingt ist oder an einer stressbedingten Vorerfahrung liegt, die die älteren Tiere im Gegensatz zu den jungen hatten, bleibt zu untersuchen. Die älteren Tiere wurden erst mit ca. 6 Monaten vereinzelt und mussten mehrere Verhaltensversuche durchlaufen. Während die jungen Tiere 3 Wochen vor dem Futterexperiment vereinzelt wurden (also mit 2 bis 4 Monaten) und noch keine Verhaltensversuche erfahren haben. Möglicherweise wirkt sich der durch die Einzelhaltung und durch die Versuche induzierte Stress auf die verschiedenen Genotypen innerhalb der alten Männchen unterschiedlich aus. Dies kann, wie UCN2 Injektionsversuche gezeigt haben, die Reaktivität der Mäuse auf ängstliches Verhalten maßgeblich beeinflussen (Henry et al., 2006).

CRH-R2-*knock out* Mäuse haben allerdings das gleiche Durchschnittsgewicht wie Wildtypmäuse und zeigen auch keine Unterschiede im Fressverhalten *ad libitum* (Bale et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). Nach Futterentzug kommt es jedoch bei CRH-R2 defizienten Mäusen zu einem leicht anorektischen Verhalten, welches sich aber nicht auf das Gewicht der Mäuse auswirkt (Bale et al., 2000). Bei jungen UCN2 überexprimierenden Mäusen beider Geschlechter führt der Futterentzug unabhängig vom Genotyp zu einer Reduktion des Körpergewichts um ca. 10%. Alle Gruppen nehmen eine vergleichbare Menge an Futter innerhalb der ersten 24 Stunden nach Futterentzug zu sich. Der hungerbedingte Stress verstärkt den anorektischen Effekt von UCN2 innerhalb der jungen UCN2-OE Männchen nicht, sondern hebt ihn auf. Die Tendenz, dass junge UCN2-OE Männchen weniger fressen als Kontrollmännchen, bleibt jedoch erhalten. Ältere UCN2 überexprimierende Mäuse verlieren weniger Gewicht während des Futterentzugs als die entsprechenden Kontrolltiere und fressen in den ersten 8 Stunden nach Futterentzug weniger im Vergleich zu den

Kontrollgeschwistern. Der durch den Hunger induzierte Stress führt bei den älteren Tieren also zu einem eher anorektischen Verhalten kurz nach dem Stressor. 24 Stunden nach Futterentzug ist dieser Effekt nicht mehr messbar und die überexprimierenden Tiere fressen wieder mehr als die Kontrolltiere. Möglicherweise ist dieser Effekt aber durch den Einfluss des circadianen Rhythmus bedingt. UCN2-*knock out* Weibchen zeigen eine tagesrhythmusbedingte Veränderung im Fressverhalten (Chen et al., 2006). Ob das Fressverhalten im Tagesrhythmus variiert, wurde allerdings nicht untersucht. Möglicherweise wirkt sich der Futterentzug während der dunklen Phase anders aus als in der hellen Phase. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die UCN2 überexprimierenden Mäuse schon vor dem Futterentzug die nötige Menge an Futter zu sich genommen haben und sich daher der Entzug nicht so massiv auf das Körpergewicht und auf das darauf folgende hyperphage Verhalten auswirkt. Um diesen Umstand auszuschließen, müsste das Fressverhalten in noch kleineren Zeitabständen untersucht und der Futterentzug auf 24 Stunden ausgedehnt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass UCN2 das Fressverhalten bei Männchen verändert. Diese Veränderung ist jedoch nicht unabhängig von anderen äußeren Faktoren. Die Futteraufnahme ist ein sensibles Zusammenspiel verschiedener Hormone und Botenstoffe. Viele Hormone, wie Neuropeptid Y oder Grehlin, die in den gleichen Kernen wie UCN2 exprimiert werden (z.B. *Ncl. arcuatus*), haben nachweislich Einfluss auf das Sättigungsgefühl (Podingbauer A., 2005). Ein weiterer Mechanismus, der zur Sättigung führt ist die Magendehnung. Die gastrische Dehnung resultiert in einer erhöhten Aktivität von vagalen affarenten Nervenfasern, die die Information an den *Ncl. tractus solitarii* weiterleiten. Von dort gelangen sie zum PVN. UCN2 i.c.v injiziert führt zu einer verzögerten Magenentleerung und könnte somit zu einem erhöhten Sättigungsgefühl beitragen (Martinez et al., 2004a; Tache et al., 2004). Die Überexpression von UCN2 verschiebt und moduliert wahrscheinlich das Sättigungsgefühl, so dass es zu verändertem Fressverhalten kommt. In welchem Maße dies geschieht, hängt offensichtlich mit vielen anderen Faktoren, wie z.B. Alter und Stress zusammen.

6.7 Untersuchungen zum Metabolismus

Die veränderte Futteraufnahme bei UCN2-OE Tieren zeigt, dass sich der Metabolismus der Tiere verändert hat. Million und seine Kollegen konnten zeigen, dass die Gabe von UCN2 die Magenentleerung verlangsamt oder sogar inhibiert. Ebenso nimmt UCN2 Einfluss auf die Darmperistaltik (Hsu and Hsueh, 2001; Million et al., 2002). Daher wurden die UCN2-OE

Tiere für eine Woche in Käfigen gehalten, in denen man die Exkremente einsammeln und deren Menge quantifizieren konnte. Die Resultate zeigen, dass UCN2 überexprimierende Mäuse die gleiche Menge Kot abgaben wie Kontrolltiere. Der einzige Unterschied zwischen den Gruppen lag in der Anzahl der abgegebenen Kot-Pellets. Hier hat sich gezeigt, dass die UCN2 überexprimierenden Tiere wesentlich mehr koten. Wodurch diese unterschiedliche Menge an Pellets bedingt ist, konnte mit der gewählten Versuchsanordnung nicht erfasst werden. Die Darmperestaltik scheint so verändert zu sein, dass es zu einer Ausscheidung von leichteren Kot-Pellets kommt. Diese Ergebnisse werden von i.c.v. Injektionsstudien unterstützt, bei denen man festgestellt hat, dass UCN, UCN2 und CRH, nicht aber UCN3, die Darmtätigkeit anregen (Martinez et al., 2004a; Martinez et al., 2002).

6.8 Corticosteron- Metaboliten aus dem Kot

Die gesammelten Kotproben wurden dazu verwendet, um Glucocorticoid- bzw. Corticosteron-Metaboliten (GCM bzw. CM) der Mäuse zu bestimmen. Eine Veränderung dieser Metaboliten steht im Zusammenhang mit einer veränderten Aktivität der Nebennierenrinde (Palme et al., 2005; Touma et al., 2003). Die Metabolisierung und die Ausscheidung der Glucocorticoide sind stark abhängig von der Spezies, von dem Geschlecht und den circadianen sowie von saisonalen Rhythmen. Manche Tiere scheiden die Metaboliten eher über den Urin aus. Bei der Maus werden ca. 53% (bei Weibchen) und ca. 73% (bei Männchen) des metabolisierten Corticosterons über den Kot wieder abgegeben. Die Durchsatzrate beträgt ca. 4 bis 10 Stunden und ist ebenso geschlechtsabhängig (Palme et al., 2005).

Um einen circadian unabhängigen Wert zu erhalten wurden Kotproben über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt. In den Kotproben des ersten Versuchstags konnten im Vergleich zu den Kotproben am siebten Versuchstag erhöhte CM-Werte sowohl bei UCN2 überexprimierenden Tieren als auch bei den Kontrolltieren festgestellt werden. Die Haltung in neuen Käfigen mit Gitterboden stellte offensichtlich einen Stressfaktor für die Tiere dar, an den sie sich im Laufe einer Woche gewöhnten. Sowohl UCN2 überexprimierende Tiere als auch Kontrolltiere zeigen eine erhöhte Nebennierenrindenaktivität, die sich in Form von ca. 1.5-fach erhöhten CM-Werten widerspiegelte. Zwischen den Genotypen konnten wir einen signifikanten Unterschied feststellen. UCN2 überexprimierende Männchen haben einen fast doppelt so hohen CM-Wert wie Kontrollmännchen. Diese Diskrepanz zeigt sich am ersten wie am siebten Versuchstag. UCN2 überexprimierende Tiere metabolisieren mehr CORT als

Kontrolltiere, obwohl wir in den basalen Plasma-CORT-Konzentrationen dieser Mäuse keine Unterschiede registrieren konnten. Es muss also einen weiteren Mechanismus geben, der die CORT-Konzentration im Blut reguliert. Im Blut gibt es Steroid-bindende Proteine, die die Menge an freien und aktiven Steroiden puffern. Corticosteron kann z.B. vom Corticosteroid-bindenden Globulin (CBG) gebunden werden und somit die Menge an freiem Corticosteron im Blut regulieren.

Ein weiterer Unterschied zeigt sich in den CM-Werten und den Plasma-CORT-Werten der gestressten Mäuse. Die Plasma- CORT-Werte nach 10-minütiger Immobilisierung, deuten darauf hin, dass die HPA-Achse bei UCN2 überexprimierenden Mäusen nicht im gleichen Maße auf den Stressor mit Ausschüttung von Corticosteron reagiert wie bei Kontrollmäusen. Bei UCN2 überexprimierenden Tieren steigen die Plasma- CORT-Werte nicht so stark an wie bei Kontrolltieren. Anscheinend reagieren UCN2 überexprimierende Tiere auf Stress mit einer verminderten CORT-Erhöhung im Blut. Die CM-Werte zeigen jedoch deutlich, dass UCN2 überexprimierende Tiere nach Stress, hervorgerufen durch die neue Umgebung, vermehrt Corticosteron metabolisieren. Touma und seine Kollegen konnten zeigen, dass der CM-Wert bei der Maus mit der Nebennierenaktivität zusammenhängt. In diesen Experimenten konnte er nachweisen, dass sowohl Stress als auch die Gabe (i.p.) von ACTH die CM-Werte erhöht und eine Gabe (i.p.) von Dexamethason die Ausschüttung von Corticosteron unterdrückt (Touma et al., 2003). Also spiegeln die Ergebnisse aus dem Kotexperiment die Nebennierenaktivität der Mäuse innerhalb von 24 Stunden wider. Anhand der Blutwerte lässt sich nur die aktuelle CORT-Konzentration bestimmen, die eine große Streuung aufweisen kann. Diese Variabilität ist durch die Blutabnahme bedingt, die nicht bei jedem Tier genau gleich abläuft. Zusätzlich unterliegt die direkte Reaktion auf Immobilisationsstress höchstwahrscheinlich einem anderen Mechanismus als die Reaktion auf eine neue Umgebung. Beide Untersuchungsmethoden zeigen jedoch, dass UCN2 eine Auswirkung auf die Produktion und/oder die Ausschüttung von Corticosteron hat. Ob UCN2 direkt an der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Corticosteron anregt oder ob es die Metabolisierung von Corticosteron in der Leber beschleunigt, muss in Folgeexperimenten untersucht werden.

6.9 Temperatur- und Fettmessung

Die Veränderungen in der Futterraufnahme und den Corticosteron-Werten zeigen, dass der Metabolismus in den UCN2 überexprimierenden Mäusen verändert ist. Die unveränderte

Körpertemperatur liefert jedoch keine zusätzlichen Hinweise auf einen veränderten Grundumsatz. Die Injektion von UCN2 i.c.v. führt hingegen bei der Ratte zu einem erhöhten Körpertemperaturanstieg 2 bis 4 Stunden nach der Injektion (Telegdy et al., 2006).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass chronischer Stress und schwere Depressionen beim Menschen zu einer Veränderung des Metabolismus führen und dies möglicherweise ausgelöst durch einen erhöhten Cortisol-Spiegel. Die Veränderung des endokrinologischen Gleichgewichts führt bei vielen Patienten mit Depression zu einer Anreicherung von intraabdominalem, viszeralem Fettgewebe (Thakore et al., 1997; Weber-Hamann et al., 2002). Ältere UCN2 überexprimierende Mäuse sind deutlich leichter, haben höhere CM-Werte und fressen wesentlich mehr als Kontrolltiere. Diese Veränderungen führen aber nicht dazu, dass sich der gesamte Körperfettanteil der Mäuse ändert. Der viszerale Fettanteil der UCN2 überexprimierenden Mäuse ist zwar tendenziell höher als bei den Kontrolltieren doch lässt sich bei einer Stichprobe von fünf Tieren pro Gruppe keine eindeutige Aussage treffen. UCN2 überexprimierende Tiere haben zwar höhere CM-Werte, aber sie scheinen nicht die typischen Symptome des Hypercortisolismus (Cushing Syndrom) zu haben. Die Tiere leiden nicht an Hautatrophie, Alopezie, Osteoporose oder Stammfettsucht, wie dies bei CRH überexprimierenden Tieren, die einen Hypercortisolismus haben, der Fall ist (Stenzel-Poore et al., 1992).

7 Zusammenfassung

Urocortin 2 (UCN2) ist ein Mitglied der Familie der CRH-verwandten Neuropeptide. Seine Existenz wurde erst im Jahr 2001 *in silico* mit Hilfe von Homologieanalysen entdeckt. Seither wurden mehrere Studien durchgeführt, die zeigen, dass UCN2 motorische Aktivität, das cardiovaculäre System, angstähnliches Verhalten, Magenentleerung, Verdauung und vor allem Fressverhalten beeinflusst. Um die *in vivo* Funktion von UCN2 besser verstehen und analysieren zu können, haben wir eine konditional UCN2 überexprimierende Mauslinie generiert. Hierfür haben wir eine einzelne Kopie der UCN2 cDNA und ein LacZ Reportergen in den *Rosa26* Locus integriert. Durch eine vorgeschaltete loxP flankierte Stoppkassette kann die Transkription von UCN2 sowie die des Reportergens mittels einer Cre-Rekombinase konditional aktiviert werden. Zur Analyse der Funktion von UCN2 im Gehirn, wurden die neu generierten R26^{stopUCN2/stopUCN2} Mäuse mit hemizygoten *Nestin-Cre* Mäusen verpaart. Durch die Expression der Cre-Rekombinase, initiiert durch den *Nestin* Promotor, wird die Stoppkassette in den Zellen des ZNS aus dem Genom entfernt und die Transkription von UCN2 und LacZ durch den *Rosa26* Promotor aktiviert.

Mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungen mit einer UCN2 spezifischen Sonde und der Reportergenaktivität konnten wir zeigen, dass UCN2 und LacZ nur im ZNS überexprimiert wird. Eine eingehende Expressionsanalyse dieser Mäuse ergab, dass die zentrale UCN2 Überexpression die Transkription des CRH-Rezeptor 1 verändert. Die Expression des Rezeptors wird in motorisch-relevanten Kernen, dem *Reticular thalamic Nucleus* und dem *Ncl. ruber*, im Gehirn erhöht. In Kernen des limbischen Systems, wie der Amygdala und dem Hippocampus wird ein konträrer Effekt erzielt. Zudem zeigen die UCN2 überexprimierenden Mäuse in Verhaltensversuchen eine höhere Aktivität und Erregbarkeit als Vergleichstiere der Kontrollgruppe. Diese Versuchsergebnisse gehen mit einer veränderten Stressachsenaktivität einher. Die UCN2 Überexpression im Gehirn führt außerdem zu einer alters- und geschlechtsabhängigen Veränderung des Fressverhaltens sowie einer veränderten Darmfunktion.

Durch diese neu generierte Mauslinie haben wir zusätzliche Erkenntnisse über die Funktionsweise von UCN2 im Gehirn erhalten. Durch Verpaarungen mit anderen Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinien oder Injektion von viralen Vektoren, die eine Cre-

Rekombinase Expression in bestimmten Regionen des Gehirns erlauben, wird es möglich sein, die endogene Funktion des Neuropeptids weiter aufzuschlüsseln.

8 Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, A.M., Lin Lim, S. and Pang, C.C. (2005) Influence of urocortin and corticotropin releasing factor on venous tone in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, **510**, 107-111.
- Aguilera, G., Nikodemova, M., Wynn, P.C. and Catt, K.J. (2004) Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides*, **25**, 319-329.
- Amat, J., Matus-Amat, P., Watkins, L.R. and Maier, S.F. (1998) Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res*, **812**, 113-120.
- Arai, M., Assil, I.Q. and Abou-Samra, A.B. (2001) Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology*, **142**, 446-454.
- Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T. and Skolnick, P. (2001) Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav*, **70**, 187-192.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W. and Lee, K.F. (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat.Genet.*, **24**, 410-414.
- Bale, T.L., Picetti, R., Contarino, A., Koob, G.F., Vale, W.W. and Lee, K.F. (2002) Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J.Neurosci.*, **22**, 193-199.
- Bale, T.L. and Vale, W.W. (2003) Increased depression-like behaviors in corticotropin-releasing factor receptor-2-deficient mice: sexually dichotomous responses. *J Neurosci*, **23**, 5295-5301.
- Berridge, C.W. and Dunn, A.J. (1989) Restraint-stress-induced changes in exploratory behavior appear to be mediated by norepinephrine-stimulated release of CRF. *J Neurosci*, **9**, 3513-3521.
- Berton, O. and Nestler, E.J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 137-151.
- Bittencourt, J.C. and Sawchenko, P.E. (2000) Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *J.Neurosci.*, **20**, 1142-1156.
- Bittencourt, J.C., Vaughan, J., Arias, C., Rissman, R.A., Vale, W.W. and Sawchenko, P.E. (1999) Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J.Comp Neurol.*, **415**, 285-312.
- Borbely, A.A., Huston, J.P. and Waser, P.G. (1975) Control of sleep states in the rat by short light-dark cycles. *Brain Res*, **95**, 89-101.
- Bosker, F.J., Westerink, B.H., Cremers, T.I., Gerrits, M., van der Hart, M.G., Kuipers, S.D., van der Pompe, G., ter Horst, G.J., den Boer, J.A. and Korf, J. (2004) Future antidepressants: what is in the pipeline and what is missing? *CNS Drugs*, **18**, 705-732.
- Brunson, K.L., Grigoriadis, D.E., Lorang, M.T. and Baram, T.Z. (2002) Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates the function of its receptor (CRF1) and

- induces CRF1 expression in hippocampal and cortical regions of the immature rat brain. *Exp Neurol*, **176**, 75-86.
- Carlson, P.J., Singh, J.B., Zarate, C.A., Jr., Drevets, W.C. and Manji, H.K. (2006) Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. *NeuroRx*, **3**, 22-41.
- Carroll, B.J. (1982) The dexamethasone suppression test for melancholia. *Br J Psychiatry*, **140**, 292-304.
- Carroll, B.J., Curtis, G.C., Davies, B.M., Mendels, J. and Sugerma, A.A. (1976) Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychol Med*, **6**, 43-50.
- Chalmers, D.T., Lovenberg, T.W. and De Souza, E.B. (1995) Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. **15**, 6340-6350.
- Chen, A., Blount, A., Vaughan, J., Brar, B. and Vale, W. (2004) Urocortin II gene is highly expressed in mouse skin and skeletal muscle tissues: localization, basal expression in corticotropin-releasing factor receptor (CRFR) 1- and CRFR2-null mice, and regulation by glucocorticoids. *Endocrinology*, **145**, 2445-2457.
- Chen, A., Zorrilla, E., Smith, S., Rousso, D., Levy, C., Vaughan, J., Donaldson, C., Roberts, A., Lee, K.F. and Vale, W. (2006) Urocortin 2-deficient mice exhibit gender-specific alterations in circadian hypothalamus-pituitary-adrenal axis and depressive-like behavior. *J Neurosci*, **26**, 5500-5510.
- Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H. and Vale, W.W. (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **90**, 8967-8971.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2172-2175.
- Coste, S.C., Kesterson, R.A., Heldwein, K.A., Stevens, S.L., Heard, A.D., Hollis, J.H., Murray, S.E., Hill, J.K., Pantely, G.A., Hohimer, A.R., Hatton, D.C., Phillips, T.J., Finn, D.A., Low, M.J., Rittenberg, M.B., Stenzel, P. and Stenzel-Poore, M.P. (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.*, **24**, 403-409.
- Cryan, J.F., Markou, A. and Lucki, I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 238-245.
- Cummings, S., Elde, R., Eells, J. and Lindall, A. (1983) Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, **3**, 1355-1368.
- Deussing, J.M. (2006) Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1-9.
- Dirks, A., Fish, E.W., Kikusui, T., van der Gugten, J., Groenink, L., Olivier, B. and Miczek, K.A. (2002) Effects of corticotropin-releasing hormone on distress vocalizations and locomotion in maternally separated mouse pups. *Pharmacol Biochem Behav*, **72**, 993-999.
- Edwards, E., Harkins, K., Wright, G. and Henn, F. (1990) Effects of bilateral adrenalectomy on the induction of learned helplessness behavior. *Neuropsychopharmacology*, **3**, 109-114.
- Ehrlich, T.H., Kenney-Hunt, J.P., Pletscher, L.S. and Cheverud, J.M. (2005) Genetic variation and correlation of dietary response in an advanced intercross mouse line produced from two divergent growth lines. *Genet Res*, **85**, 211-222.
- Friedrich, G. and Soriano, P. (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, **5**, 1513-1523.

- Gass, P., Reichardt, H.M., Strekalova, T., Henn, F. and Tronche, F. (2001) Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: models for depression and anxiety? *Physiol Behav*, **73**, 811-825.
- Grammatopoulos, D.K. and Chrousos, G.P. (2002) Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 436-444.
- Grammatopoulos, D.K., Dai, Y., Randeva, H.S., Levine, M.A., Karteris, E., Easton, A.J. and Hillhouse, E.W. (1999) A novel spliced variant of the type 1 corticotropin-releasing hormone receptor with a deletion in the seventh transmembrane domain present in the human pregnant term myometrium and fetal membranes. *Mol Endocrinol*, **13**, 2189-2202.
- Groenink, L., Dirks, A., Verdouw, P.M., Schipholt, M., Veening, J.G., van der Gugten, J. and Olivier, B. (2002) HPA axis dysregulation in mice overexpressing corticotropin releasing hormone. *Biol Psychiatry*, **51**, 875-881.
- Hammack, S.E., Pepin, J.L., DesMarteau, J.S., Watkins, L.R. and Maier, S.F. (2003a) Low doses of corticotropin-releasing hormone injected into the dorsal raphe nucleus block the behavioral consequences of uncontrollable stress. *Behav Brain Res*, **147**, 55-64.
- Hammack, S.E., Schmid, M.J., LoPresti, M.L., Der-Avakian, A., Pellymounter, M.A., Foster, A.C., Watkins, L.R. and Maier, S.F. (2003b) Corticotropin releasing hormone type 2 receptors in the dorsal raphe nucleus mediate the behavioral consequences of uncontrollable stress. *J Neurosci*, **23**, 1019-1025.
- Handa, R.J., Nunley, K.M., Lorens, S.A., Louie, J.P., McGivern, R.F. and Bollnow, M.R. (1994) Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol Behav*, **55**, 117-124.
- Hegerl, U., Holsboer, F., Möller. (2004) Kompetenznetz-Depression. Vol. 2004. <http://www.kompetenznetz-depression.de/>
- Heinrichs, S.C., Britton, K.T. and Koob, G.F. (1991) Both conditioned taste preference and aversion induced by corticotropin-releasing factor. **40**, 717-721.
- Henry, B., Vale, W. and Markou, A. (2006) The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *J Neurosci*, **26**, 9142-9152.
- Hilscher, C. (2006) Psychologische Beratung: Depression. <http://www.onlineberatung-therapie.de/stoerung/depression/depression.html>
- Hinkle, R.T., Donnelly, E., Cody, D.B., Bauer, M.B. and Isfort, R.J. (2003) Urocortin II treatment reduces skeletal muscle mass and function loss during atrophy and increases nonatrophying skeletal muscle mass and function. *Endocrinology*, **144**, 4939-4946.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Holsboer, F. (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J.Psychiatr.Res.*, **33**, 181-214.
- Holsboer, F. (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, **23**, 477-501.
- Holsboer, F., Haack, D., Gerken, A. and Vecsei, P. (1984a) Plasma dexamethasone concentrations and differential suppression response of cortisol and corticosterone in depressives and controls. *Biol Psychiatry*, **19**, 281-291.
- Holsboer, F., von Bardeleben, U., Gerken, A., Stalla, G.K. and Muller, O.A. (1984b) Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression. **311**, 1127.

- Hsu, s.Y. and Hsueh, A.J.W. (2001) Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the corticotropin-releasing hormone receptor. *Nature Medicine*, Vol. 7, pp. 605-611.
- Imaki, J., Imaki, T., Vale, W. and Sawchenko, P.E. (1991) Distribution of corticotropin-releasing factor mRNA and immunoreactivity in the central auditory system of the rat. *Brain Res*, **547**, 28-36.
- Inoue, K., Valdez, G.R., Reyes, T.M., Reinhardt, L.E., Tabarin, A., Rivier, J., Vale, W.W., Sawchenko, P.E., Koob, G.F. and Zorrilla, E.P. (2003) Human urocortin II, a selective agonist for the type 2 corticotropin-releasing factor receptor, decreases feeding and drinking in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**, 385-393.
- Jacobson, L., Muglia, L.J., Weninger, S.C., Pac inverted question markak, K. and Majzoub, J.A. (2000) CRH deficiency impairs but does not block pituitary-adrenal responses to diverse stressors. *Neuroendocrinology*, **71**, 79-87.
- Jahn, O., Tezval, H., van Werven, L., Eckart, K. and Spiess, J. (2004) Three-amino acid motifs of urocortin II and III determine their CRF receptor subtype selectivity. *Neuropharmacology*, **47**, 233-242.
- Jones, D.N., Kortekaas, R., Slade, P.D., Middlemiss, D.N. and Hagan, J.J. (1998) The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **138**, 124-132.
- Joyner, A.L. (1993) *Gene Targeting. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Keck, P.E., Jr. (2005) Bipolar depression: a new role for atypical antipsychotics? *Bipolar Disord*, **7 Suppl 4**, 34-40.
- Kessler, R.C. and Magee, W.J. (1994) Childhood family violence and adult recurrent depression. *J Health Soc Behav*, **35**, 13-27.
- Kielholz, P. (1973) *Die larvierte Depression*. Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart Wien.
- Kirby, L.G., Rice, K.C. and Valentino, R.J. (2000) Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, **22**, 148-162.
- Kishimoto, T., Pearse, R.V., 2nd, Lin, C.R. and Rosenfeld, M.G. (1995) A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1108-1112.
- Kishimoto, T., Radulovic, J., Radulovic, M., Lin, C.R., Schrick, C., Hooshmand, F., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G. and Spiess, J. (2000) Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.*, **24**, 415-419.
- Koob, G.F. and Heinrichs, S.C. (1999) A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. **848**, 141-152.
- Koob, G.F., Heinrichs, S.C., Pich, E.M., Menzaghi, F., Baldwin, H., Miczek, K. and Britton, K.T. (1993) The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. **172**, 277-289.
- Lachman, H.M., Papolos, D.F., Boyle, A., Sheftel, G., Juthani, M., Edwards, E. and Henn, F.A. (1993) Alterations in glucocorticoid inducible RNAs in the limbic system of learned helpless rats. *Brain Res*, **609**, 110-116.
- Laviola, G., Adriani, W., Morley-Fletcher, S. and Terranova, M.L. (2002) Peculiar response of adolescent mice to acute and chronic stress and to amphetamine: evidence of sex differences. *Behav Brain Res*, **130**, 117-125.
- Lee, A.L., Ogle, W.O. and Sapolsky, R.M. (2002) Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord*, **4**, 117-128.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M.H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T.M., Gulyas, J., Fischer, W., Bilezikjian, L., Rivier, J., Sawchenko, P.E. and Vale,

- W.W. (2001) Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7570-7575.
- Lovejoy, D.A. and Balment, R.J. (1999) Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, **115**, 1-22.
- Lovenberg, T.W., Chalmers, D.T., Liu, C. and De Souza, E.B. (1995a) CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*, **136**, 4139-4142.
- Lovenberg, T.W., Liaw, C.W., Grigoriadis, D.E., Clevenger, W., Chalmers, D.T., De Souza, E.B. and Oltersdorf, T. (1995b) Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **92**, 836-840.
- Lowry, C.A., Rodda, J.E., Lightman, S.L. and Ingram, C.D. (2000) Corticotropin-releasing factor increases in vitro firing rates of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for activation of a topographically organized mesolimbocortical serotonergic system. *J Neurosci*, **20**, 7728-7736.
- Lu, A. (2005) Site-specific overexpression of corticotropin-releasing hormone (CRH) in the mouse brain - modelling central CRH system hyperactivity. *Biowissenschaften, TUM-Systematik BIO 781d*. TUM, Munich.
- Mao, X., Fujiwara, Y., Chapdelaine, A., Yang, H. and Orkin, S.H. (2001) Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood*, **97**, 324-326.
- Martinez, V., Wang, L., Million, M., Rivier, J. and Tache, Y. (2004a) Urocortins and the regulation of gastrointestinal motor function and visceral pain. *Peptides*, **25**, 1733-1744.
- Martinez, V., Wang, L., Rivier, J., Grigoriadis, D. and Tache, Y. (2004b) Central CRF, urocortins and stress increase colonic transit via CRF1 receptors while activation of CRF2 receptors delays gastric transit in mice. *J Physiol*, **556**, 221-234.
- Martinez, V., Wang, L., Rivier, J.E., Vale, W. and Tache, Y. (2002) Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. **301**, 611-617.
- Masuda, Y., Ishigooka, S. and Matsuda, Y. (2001) Behaviors of mice given forced-swimming. *Exp Anim*, **50**, 331-335.
- Maswood, S., Barter, J.E., Watkins, L.R. and Maier, S.F. (1998) Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*, **783**, 115-120.
- Mezey, E. and Palkovits, M. (1991) Time dependent changes in CRF and its mRNA in the neurons of the inferior olive following surgical transection of the olivocerebellar tract in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, **10**, 55-59.
- Million, M., Maillot, C., Saunders, P., Rivier, J., Vale, W. and Tache, Y. (2002) Human urocortin II, a new CRF-related peptide, displays selective CRF(2)-mediated action on gastric transit in rats. **282**, G34-G40.
- Modell, S., Yassouridis, A., Huber, J. and Holsboer, F. (1997) Corticosteroid receptor function is decreased in depressed patients. *Neuroendocrinology*, **65**, 216-222.
- Moreau, J.L., Kilpatrick, G. and Jenck, F. (1997) Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. *Neuroreport*, **8**, 1697-1701.
- Muglia, L., Jacobson, L., Dikkes, P. and Majzoub, J.A. (1995) Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature*, **373**, 427-432.

- Muller, M.B., Landgraf, R., Preil, J., Sillaber, I., Kresse, A.E., Keck, M.E., Zimmermann, S., Holsboer, F. and Wurst, W. (2000) Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. *Endocrinology*, **141**, 4262-4269.
- Muller, M.B., Zimmermann, S., Sillaber, I., Hagemeyer, T.P., Deussing, J.M., Timpl, P., Kormann, M.S., Droste, S.K., Kuhn, R., Reul, J.M., Holsboer, F. and Wurst, W. (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci*, **6**, 1100-1107.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Nagy, A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, **26**, 99-109.
- Nagy, A. (2001) Published Cre-transgenic-lines. <http://www.mshri.on.ca/nagy/Cre-pub.html>
- Nemeroff, C.B., Owens, M.J., Bissette, G., Andorn, A.C. and Stanley, M. (1988) Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch.Gen.Psychiatry*, **45**, 577-579.
- Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T. and Vale, W. (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, **226**, 1342-1344.
- Ohata, H. and Shibasaki, T. (2004) Effects of urocortin 2 and 3 on motor activity and food intake in rats. *Peptides*, **25**, 1703-1709.
- Oki, Y., Iwabuchi, M., Masuzawa, M., Watanabe, F., Ozawa, M., Iino, K., Tominaga, T. and Yoshimi, T. (1998) Distribution and concentration of urocortin, and effect of adrenalectomy on its content in rat hypothalamus. *Life Sci*, **62**, 807-812.
- Owens, M.J. and Nemeroff, C.B. (1991) Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol.Rev.*, **43**, 425-473.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S.M. and Mostl, E. (2005) Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann N Y Acad Sci*, **1040**, 162-171.
- Pedersen, W.A., Wan, R., Zhang, P. and Mattson, M.P. (2002) Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J Neurosci*, **22**, 404-412.
- Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P. and Vale, W. (1995) Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2969-2973.
- Perrin, M.H., Donaldson, C.J., Chen, R., Lewis, K.A. and Vale, W.W. (1993) Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology*, **133**, 3058-3061.
- Pich, E.M., Heinrichs, S.C., Rivier, C., Miczek, K.A., Fisher, D.A. and Koob, G.F. (1993) Blockade of pituitary-adrenal axis activation induced by peripheral immunoneutralization of corticotropin-releasing factor does not affect the behavioral response to social defeat stress in rats. **18**, 495-507.
- Pisarchik, A. and Slominski, A.T. (2001) Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *Faseb J*, **15**, 2754-2756.
- Poddingbauer A., E.C. (2005) Regulation der Nahrungsaufnahme: Physiologische Mechanismen und klinische Relevanz. *Journal für Ernährungsmedizin*, **7**, 22-29.
- Porsolt, R.D. (2000) Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci*, **11**, 53-58.

- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N. and Jalfre, M. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, **47**, 379-391.
- Potter, E., Behan, D.P., Fischer, W.H., Linton, E.A., Lowry, P.J. and Vale, W.W. (1991) Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature*, **349**, 423-426.
- Potter, E., Behan, D.P., Linton, E.A., Lowry, P.J., Sawchenko, P.E. and Vale, W.W. (1992) The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4192-4196.
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P.E. and Vale, W. (1994) Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 8777-8781.
- Preil, J., Muller, M.B., Gesing, A., Reul, J.M., Sillaber, I., van Gaalen, M.M., Landgrebe, J., Holsboer, F., Stenzel-Poore, M. and Wurst, W. (2001) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mice deficient for CRH receptors 1 and 2. **142**, 4946-4955.
- Raadsheer, F.C., Hoogendijk, W.J., Stam, F.C., Tilders, F.J. and Swaab, D.F. (1994) Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*, **60**, 436-444.
- Raadsheer, F.C., van Heerikhuize, J.J., Lucassen, P.J., Hoogendijk, W.J., Tilders, F.J. and Swaab, D.F. (1995) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am.J.Psychiatry*, **152**, 1372-1376.
- Reul, J.M. and Holsboer, F. (2002) Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin.Pharmacol.*, **2**, 23-33.
- Reyes, T.M., Lewis, K., Perrin, M.H., Kunitake, K.S., Vaughan, J., Arias, C.A., Hogenesch, J.B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W.W. and Sawchenko, P.E. (2001) Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2843-2848.
- Ross, P.C., Kostas, C.M. and Ramabhadran, T.V. (1994) A variant of the human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: cloning, expression and pharmacology. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 1836-1842.
- Safran, M., Kim, W.Y., Kung, A.L., Horner, J.W., DePinho, R.A. and Kaelin, W.G., Jr. (2003) Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination. *Mol Imaging*, **2**, 297-302.
- Salas, M.A., Brown, O.A., Perone, M.J., Castro, M.G. and Goya, R.G. (1997) Effect of the corticotrophin releasing hormone precursor on interleukin-6 release by human mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol*, **85**, 35-39.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Seasholtz, A.F., Thompson, R.C. and Douglass, J.O. (1988) Identification of a cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the rat corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol*, **2**, 1311-1319.
- Seligman, M.E. and Maier, S.F. (1967) Failure to escape traumatic shock. *J Exp Psychol*, **74**, 1-9.
- Seong, E., Seasholtz, A.F. and Burmeister, M. (2002) Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet.*, **18**, 643-650.
- Sherman, A.D., Allers, G.L., Petty, F. and Henn, F.A. (1979) A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. *Neuropharmacology*, **18**, 891-893.

- Sherman, A.D., Sacquitne, J.L. and Petty, F. (1982) Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, **16**, 449-454.
- Sirinathsinghji, D.J., Rees, L.H., Rivier, J. and Vale, W. (1983) Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat. *Nature*, **305**, 232-235.
- Slawecki, C.J., Somes, C., Rivier, J.E. and Ehlers, C.L. (1999) Neurophysiological effects of intracerebroventricular administration of urocortin. *Peptides*, **20**, 211-218.
- Smith, G.W., Aubry, J.M., Dellu, F., Contarino, A., Bilezikjian, L.M., Gold, L.H., Chen, R., Marchuk, Y., Hauser, C., Bentley, C.A., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W. and Lee, K.F. (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*, **20**, 1093-1102.
- Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, **21**, 70-71.
- Spina, M., Merlo-Pich, E., Chan, R.K., Basso, A.M., Rivier, J., Vale, W. and Koob, G.F. (1996) Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*, **273**, 1561-1564.
- Staub, D.R., Spiga, F. and Lowry, C.A. (2005) Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, **1044**, 176-189.
- Stenzel-Poore, M.P., Cameron, V.A., Vaughan, J., Sawchenko, P.E. and Vale, W. (1992) Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology*, **130**, 3378-3386.
- Stenzel-Poore, M.P., Duncan, J.E., Rittenberg, M.B., Bakke, A.C. and Heinrichs, S.C. (1996) CRH overproduction in transgenic mice: behavioral and immune system modulation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **780**, 36-48.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B. and Simon, P. (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **85**, 367-370.
- Summers, C.H., Kampshoff, J.L., Ronan, P.J., Lowry, C.A., Prestbo, A.A., Korzan, W.J. and Renner, K.J. (2003) Monoaminergic activity in subregions of raphe nuclei elicited by prior stress and the neuropeptide corticotropin-releasing factor. *J Neuroendocrinol*, **15**, 1122-1133.
- Swiergiel, A.H. and Dunn, A.J. (1999) CRF-deficient mice respond like wild-type mice to hypophagic stimuli. *Pharmacol Biochem Behav*, **64**, 59-64.
- Tache, Y., Martinez, V., Wang, L. and Million, M. (2004) CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol*, **141**, 1321-1330.
- Telegdy, G., Adamik, A. and Toth, G. (2006) The action of urocortins on body temperature in rats. *Peptides*, **27**, 2289-2294.
- Thakore, J.H., Richards, P.J., Reznick, R.H., Martin, A. and Dinan, T.G. (1997) Increased intra-abdominal fat deposition in patients with major depressive illness as measured by computed tomography. *Biol Psychiatry*, **41**, 1140-1142.
- Thompson, R.F. (2001) *Das Gehirn*. Spektrum Verlag, Heidelberg Berlin.
- Timpl, P., Spanagel, R., Sillaber, I., Kresse, A., Reul, J.M., Stalla, G.K., Blanquet, V., Steckler, T., Holsboer, F. and Wurst, W. (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat.Genet.*, **19**, 162-166.
- Touma, C., Sachser, N., Mostl, E. and Palme, R. (2003) Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol*, **130**, 267-278.

- Trepel. (1999) *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. Urban und Fischer, München Stuttgart Jena Lübeck Ulm.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R. and Schutz, G. (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet*, **23**, 99-103.
- Turnbull, A.V. and Rivier, C. (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med*, **215**, 1-10.
- Turnbull, A.V., Vaughan, J., Rivier, J.E., Vale, W.W. and Rivier, C. (1999) Urocortin is not a significant regulator of intermittent electrofootshock-induced adrenocorticotropin secretion in the intact male rat. *Endocrinology*, **140**, 71-78.
- Valdez, G.R., Inoue, K., Koob, G.F., Rivier, J., Vale, W. and Zorrilla, E.P. (2002) Human urocortin II: mild locomotor suppressive and delayed anxiolytic-like effects of a novel corticotropin-releasing factor related peptide. *Brain Res*, **943**, 142-150.
- Valdez, G.R., Zorrilla, E.P., Rivier, J., Vale, W.W. and Koob, G.F. (2003) Locomotor suppressive and anxiolytic-like effects of urocortin 3, a highly selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist. *Brain Res*, **980**, 206-212.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. and Rivier, J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, **213**, 1394-1397.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J.C., Chan, R.K., Li, H.Y., Arias, C., Prins, G.S., Perrin, M., Vale, W. and Sawchenko, P.E. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J.Comp Neurol.*, **428**, 191-212.
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A.V., Lovejoy, D., Rivier, C. and . (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*, **378**, 287-292.
- Venihaki, M., Sakihara, S., Subramanian, S., Dikkes, P., Weninger, S.C., Liapakis, G., Graf, T. and Majzoub, J.A. (2004) Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours. *J Neuroendocrinol*, **16**, 411-422.
- Vetter, D.E., Li, C., Zhao, L., Contarino, A., Liberman, M.C., Smith, G.W., Marchuk, Y., Koob, G.F., Heinemann, S.F., Vale, W. and Lee, K.F. (2002) Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet*, **31**, 363-369.
- Wang, C. and Kotz, C.M. (2002) Urocortin in the lateral septal area modulates feeding induced by orexin A in the lateral hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **283**, R358-367.
- Weber-Hamann, B., Hentschel, F., Kniest, A., Deuschle, M., Colla, M., Lederbogen, F. and Heuser, I. (2002) Hypercortisolemic depression is associated with increased intra-abdominal fat. *Psychosom Med*, **64**, 274-277.
- Weitbrecht, H.J. (1973) *Psychiatrie im Grundriss*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Weninger, S.C., Dunn, A.J., Muglia, L.J., Dikkes, P., Miczek, K.A., Swiergiel, A.H., Berridge, C.W. and Majzoub, J.A. (1999a) Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8283-8288.
- Weninger, S.C., Muglia, L.J., Jacobson, L. and Majzoub, J.A. (1999b) CRH-deficient mice have a normal anorectic response to chronic stress. *Regul Pept*, **84**, 69-74.

- Weninger, S.C., Peters, L.L. and Majzoub, J.A. (2000) Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is up-regulated by stress and corticotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology*, **141**, 256-263.
- Wiley, K.E. and Davenport, A.P. (2004) CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators. *Br J Pharmacol*, **143**, 508-514.
- Wong, M.L., al-Shekhlee, A., Bongiorno, P.B., Esposito, A., Khatri, P., Sternberg, E.M., Gold, P.W. and Licinio, J. (1996) Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary. *Mol Psychiatry*, **1**, 307-312.
- Yamauchi, N., Otagiri, A., Nemoto, T., Sekino, A., Oono, H., Kato, I., Yanaihara, C. and Shibasaki, T. (2005) Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat. *J Neuroendocrinol*, **17**, 656-663.
- Zambrowicz, B.P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G. and Soriano, P. (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3789-3794.
- Zobel, A.W., Nickel, T., Kunzel, H.E., Ackl, N., Sonntag, A., Ising, M. and Holsboer, F. (2000) Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res*, **34**, 171-181.
- Zorrilla, E.P., Reinhardt, L.E., Valdez, G.R., Inoue, K., Rivier, J.E., Vale, W.W. and Koob, G.F. (2004) Human urocortin 2, a corticotropin-releasing factor (CRF)2 agonist, and ovine CRF, a CRF1 agonist, differentially alter feeding and motor activity. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**, 1027-1034.

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich Dr. Jan Deussing und Prof. Dr. Wolfgang Wurst für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas danken. Ohne ihre Unterstützung in fachlicher, personeller und finanzieller Hinsicht sowie ihre Geduld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dem ganzen Team der Arbeitsgruppe Deussing/Wurst möchte ich an dieser Stelle für ihre Hilfe und Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors danken.

Außerdem möchte ich Susanne Bourier und Ailing Lu für die Hilfe zur Generierung der Mäuse sowie Chadi Touma und Michael Czisch für die Erhebung der Daten zum Metabolismus und Fettgehalt recht herzlich danken. Genauso herzlich möchte ich mich bei Sabrina, Claudia, Daniela, Tanja und Annette bedanken, die mir immer mit Rat und Tat bei der Klonierung, Genotypisierung, Blutentnahme und ISH zur Seite gestanden haben.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Gierl und Prof. Dr. Schneitz für ihre Bereitschaft meine Dissertation zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen.

Vielen Dank auch an Verena, Gitti, Iris, Juliane und Sebastian für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die aufmunternden und motivierenden Worte.

Ein persönliches Dankeschön geht an meine Familie, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

Bei meinem Sohn möchte ich mich noch mal besonders bedanken, da er immer brav geschlafen hat während ich an dieser Arbeit geschrieben habe.

10 Lebenslauf

Juliane Rhode

Geburtsdatum: 09.07.1976
Geburtsort: Graz/ Österreich
Familienstand: Verheiratet/ 1 Kind

Schulbildung

1983 - 1987 Volksschule St. Johannis in Bayreuth
1987 - 1990 Wirtschaft-Wissenschaftliches Gymnasium in Bayreuth
1990 - 1 1996 Mathematisch Naturwissenschaftliches Gymnasium in Sonthofen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,2)

Hochschulbildung

1996 - 1997 Burlington County College in Pemberton New Jersey/ USA
Grundkurs in Biologie und Englisch
1997 - 2003 Biologiestudium an der LMU in München
Hauptfach: Neurobiologie
Nebenfächer: Genetik, Zellbiologie, Biochemie
Abschluss: Diplom Biologie (Note: 1,1)
2003 - 2007 Promotionsstudium an der TU in München
Anfertigung der Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. Wurst und Dr. Deussing am MPI für Psychiatrie

11 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**Generierung und Charakterisierung einer konditionalen Urocortin 2
überexprimierenden Mauslinie**

im Max Planck Institut für Psychiatrie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wurst/
Dr. Deussing

Unter der Anleitung und Betreuung durch

Dr. Jan Deussing und Prof. Dr. Wolfgang Wurst

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß §6 Abs.5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt
- Die vollständige Dissertation wurde in _____
_____ veröffentlicht. Die Fakultät für _____ hat der
Veröffentlichung zugestimmt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den _____